

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Pediatría**



**VALORACIÓN DE LA RESPUESTA  
INMUNOLÓGICA LINFOCITARIA EN  
PACIENTES CON BRONQUIOLITIS AGUDA**

MEDICIÓN DE PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA,  
QUIMIOQUINAS Y RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS

**TESIS DOCTORAL  
GONZALO OÑORO OTERO**

**MADRID, 2017**

La presente tesis doctoral ha sido patrocinada parcialmente a través de un convenio entre la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Niño Jesús y la Sociedad Estatal de Loterías y Apuestas del Estado.

*El arte de la medicina consiste en entretener al paciente  
mientras la naturaleza cura la enfermedad*

Voltaire

# AGRADECIMIENTOS

---

Hace seis años el Dr. Juan Casado Flores me propuso realizar un trabajo de investigación sobre la bronquiolitis aguda como complemento a mi formación clínica que finalizaba por aquella época al acabar la residencia de Pediatría en el HIU Niño Jesús. Con algunas idas y vueltas, dicho trabajo de investigación se ha acabado concretando en esta tesis doctoral. Por ello, el primer agradecimiento debe ser para él, no solo por aceptar ser el director de esta tesis, sino por alentarme siempre a ir un paso más allá.

Gracias al Dr. Manuel Ramírez Orellana por acceder a codirigir esta tesis y por abrirme las puertas de su casa, el Laboratorio de Investigación Oncológica de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Niño Jesús. Por aceptar y respetar que esta tesis no se iba a escribir en un par de años y porque sin su distante vigilancia no hubiera sido posible realizarla.

Gracias al Dr. Gustavo Melen por enseñarme todo lo necesario para llevar a cabo los experimentos de este trabajo. Por su paciencia al mirarme cómo pipeteaba cientos de veces en pequeños tubos. Por encontrar una solución a todos los problemas que me iban surgiendo y, sobre todo, por hacerme más amenas todas las horas –que fueron muchas– que pasamos juntos en el laboratorio. Valar Morghulis Gustavo.

Gracias también al resto del personal del Laboratorio de Investigación Oncológica de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Niño Jesús por su ayuda en lo que para ellos eran nimiedades, pero a mí me parecían enormes problemas irresolubles desde el punto de vista de un clínico y no de un investigador.

Gracias al Dr. Alberto García Salido por permitirme acompañarle en gran parte de este camino. Gracias por ser colega, compañero y amigo, pero sobre todo por ser el Maestro Jedi que todo Padawan quisiera tener.

Gracias a los doctores Esther Pérez Suarez, Ignacio Mastro Martínez y Beatriz Cabeza Martín por recorrer el camino antes que yo, dejando muchas miguitas de pan para que el trayecto fuera más sencillo de seguir.

Gracias al personal clínico de la UCIP del HIU Niño Jesús por colaborar en este trabajo y sobre todo al personal de enfermería y auxiliar de clínica por aceptarme ayudarme siempre con una sonrisa en la recolección de muestras.

Gracias a los niños y sus padres incluidos en este trabajo. Con su consentimiento han permitido avanzar un paso más hacia el conocimiento del “cómo” y del “porqué” de la bronquiolitis aguda. Ellos son los verdaderos héroes de cualquier trabajo como el que aquí presento.

Gracias a la Dra. Cristina Oñoro Otero, mi hermana, por estar siempre dispuesta a corregir la forma de este texto aunque no entendiera ni una palabra del contenido de lo que estaba escrito.

Gracias a mis padres por inculcarme desde pequeño la importancia del estudio y alentarme a finalizar mis proyectos.

Y sobre todo gracias a Elena Blanco, por recordarme periódicamente la responsabilidad que había adquirido al embarcarme en este proyecto y la necesidad de devolver en forma de trabajo finalizado la confianza que todas las personas anteriormente nombradas habían depositado en mí. Sin ella esta tesis hubiera sido abandonada hace cuatro años. Gracias por estar siempre a mi lado, tanto en los buenos como en los malos momentos.

Y por último, gracias a Guille, por llegar en el momento adecuado. Espero poder explicarte algún día la diferencia entre Médico y Doctor.

Madrid, marzo de 2017

# GLOSARIO

---

**BiPAP:** *Bilevel positive airway pressure* (presión positiva en vía aérea a dos niveles)

**CPAP:** *Continuous positive air pressure* (presión continua en la vía aérea)

**GADPH:** Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

**GN:** Gafas nasales

**IL-4:** Interleuquina 4

**INF $\gamma$ :** Interferón Gamma

**IP-10:** Proteína 10 inducible por interferón Gamma

**RTqPCR:** *Real Time quantitative Protein Chain Reaction*

**LT:** Linfocito tipo T

**LTc:** Linfocito T Citotóxico

**LTh:** Linfocitos T tipo *Helper*

**LTh1:** Linfocito T tipo *Helper* tipo 1

**LTh2:** Linfocito T tipo *Helper* tipo 2

**LTreg:** Linfocito T tipo regulador

**MDC:** Quimioquina derivada de macrófago

**MIG:** Monoquina inducida por Interferón Gamma

**OAF:** Oxigenoterapia de alto flujo

**PCR:** Proteína C reactiva

**PCT:** Procalcitonina

**TARC:** Quimioquina reguladora de la actividad del timo

**UCIP:** Unidad de cuidados intensivos pediátricos

**VRS:** Virus respiratorio sincitial

**VNI:** Ventilación no invasiva

**VMC:** Ventilación mecánica convencional

**WD:** Wood-Downes

# RESUMEN

---

## 1. Introducción

La bronquiolitis aguda es una patología que se caracteriza por la inflamación bronquiolar durante una infección viral en un menor de dos años de edad; en la gran mayoría de los casos está provocada por el Virus Respiratorio Sincitial (VRS) y constituye la patología con mayor número de ingresos durante la época del lactante. Además, muchos de ellos requieren atención en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP). No existe un tratamiento etiológico eficaz y las terapias médicas empleadas son de dudosa eficacia salvo el soporte respiratorio del paciente que lo precise.

La respuesta inmune durante una bronquiolitis aguda se realiza en un primer momento a través de una reacción innata. Ésta es poco específica contra el patógeno que desencadenó el proceso y, además, muchos de los virus que provocan la bronquiolitis son capaces de evadirla.

La respuesta inmune adaptativa es más específica y dirigida, por lo que se considera más eficaz que la respuesta innata. Aparece más tardíamente y es llevada a cabo principalmente por los Linfocitos tipo B y los Linfocitos tipo T. Estos últimos se subdividen en linfocitos tipo T citotóxicos (LTc, encargados del reconocimiento y destrucción de células infectadas) y de linfocitos tipo T *helper* [LTh, los cuales ejercen su función controlando la respuesta inmune contra patógenos intracelulares y en enfermedades autoinmunes en el caso de ser una respuesta tipo 1 (LTh1) y contra parásitos extracelulares o procesos alérgicos en el caso de los tipo 2(LTh2)].

Debido a la etiología viral de la bronquiolitis el sistema inmune debería resolverla a través de una respuesta inmune adaptativa, con un aumento de actividad de los LTc controlados por los LTh1.

La llegada al organismo de cualquier agente infeccioso como sucede en cualquier bronquiolitis aguda no es suficiente para que las células antes mencionadas sean reclutadas al lugar donde son necesarias para ejercer su



función. Para ello se requiere de un sistema de señalización capaz de ser reconocido por las células del sistema inmune, que les permita migrar a los órganos donde son requeridos. Una parte fundamental de este sistema de señalización es el sistema de Quimioquinas, una familia de citoquinas que ejercen su función atrayendo a las células del sistema inmune allí donde son segregadas. Esta familia está formada por más de 50 proteínas, que son reconocidas por otros tantos receptores de quimioquinas que se encuentran en la membrana de las células del sistema inmune. Muchas quimioquinas son específicas para ciertas células del sistema inmune de tal forma que el reclutamiento resultante va dirigido a unas células en concreto.

Entre otras muchas sustancias, durante una bronquiolitis aguda se segregan quimioquinas de manera local con el objetivo de atraer a la vía aérea a las células del sistema inmune que se precisan en cada momento. De esta manera se cierra el círculo necesario para la activación del sistema inmune y se realiza el reclutamiento del celular a los órganos donde se está produciendo la infección.

## 2. Hipótesis

Durante una bronquiolitis, la respuesta inmune –tanto el tipo como la potencia de la misma– influye en la gravedad del cuadro clínico. Teniendo esto en cuenta, el estudio inmunológico en el momento del ingreso de estos pacientes ayudará a diferenciar entre quienes presentan una evolución desfavorable y quienes desarrollan un cuadro clínico más benigno.

## 3. Objetivos

El objetivo principal del presente estudio es describir la respuesta inmunológica linfocitaria tipo T en niños ingresados por bronquiolitis aguda en UCIP a través de la medición de patrones de expresión de citoquina, de receptores de quimioquinas y sus ligandos.

Los objetivos secundarios son:

1. Analizar las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con bronquiolitis aguda que requieren ingreso en UCIP.
2. Conocer la evolución de los pacientes con bronquiolitis aguda que ingresan en UCIP en nuestro medio.
3. Analizar la relación entre el tipo de respuesta inmunitaria a cargo de los LT y los parámetros epidemiológicos, clínicos, analíticos y evolutivos en pacientes con bronquiolitis aguda ingresados en UCIP.
4. Analizar el patrón de expresión de receptores de quimioquinas específicos de LTh y sus ligandos y su asociación a alguna característica epidemiológica, clínica, analítica y evolutiva en pacientes con bronquiolitis aguda ingresados en UCIP.

#### **4. Material y métodos**

Para llevar a cabo este trabajo se realizó un estudio prospectivo de los pacientes ingresados por bronquiolitis aguda en la UCIP del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús durante la epidemia del Virus Respiratorio Sincitial (Noviembre 2012 a Febrero 2013). Tras la inclusión en el estudio se extrajo una muestra de sangre durante las primeras 24 horas de ingreso.

Durante el ingreso se procedió a la recogida de datos epidemiológicos (fecha de nacimiento, sexo, fecha de ingreso hospitalario, fecha de ingreso en Cuidados Intensivos, fecha de alta de Cuidados Intensivos, fecha de alta hospitalaria, antecedentes personales de interés, procedencia del ingreso), clínicos (días de evolución de los síntomas, presencia de fiebre y/o apneas, gravedad de la bronquiolitis según la escala de Wood-Downes (WD) modificada por Farrés en el momento del ingreso), analíticos (leucocitos en sangre periférica, neutrófilos totales en sangre periférica, PCR y PCT en analítica realizada el ingreso, crecimiento en cultivos realizados y presencia de VRS en secreciones nasofaríngeas), terapéuticos (corticoterapia, antibioterapia, necesidad de soporte respiratorio y tipo, duración de dicho soporte) y evolutivos

(éxitus durante el ingreso o necesidad de reingreso en UCIP, duración del ingreso) derivados de la práctica clínica habitual de la unidad.

La muestra de sangre periférica obtenida se procesó para la recolección de células mononucleares del paciente y de plasma sanguíneo.

El plasma se empleó para el estudio de las quimioquinas IP-10, MIG (específicas de respuestas LTh1) y TARC y MDC (específicas de respuestas LTh2) en sangre periférica mediante técnica de ELISA. Las células mononucleares se emplearon en el estudio del inmunofenotipo linfocitario a través de la expresión génica de los marcadores CD4 (marcador de LTh), CD8 (marcador de LTc), INF $\gamma$  (marcador clásico de LTh1), IL-4 (marcador clásico de LTh2), FOXP3 (marcadores de los LTh reguladores), CXCR3 (receptores específico de las quimioquinas IP-10 y MIG) y CCR4 (receptor específico de las quimioquinas TARC y MDC) mediante reacción en cadena de la polimerasa en tipo real (RTqPCR).

Finalmente, se realizaron los estudios estadísticos necesarios para conocer las asociaciones entre los datos clínicos y experimentales obtenidos con el fin de llevar a cabo los objetivos anteriormente descritos.

Dado que, en la mayoría de los casos, los datos obtenidos no seguían una distribución normal, se utilizaron preferentemente test no paramétricos para el análisis. Para valores independientes se empleó el test de la U de Mann-Whitney (significación unilateral) para comparar dos categorías, mientras que la prueba de Kruskal-Wallis se empleó en el caso de más de tres categorías. Para las variables dependientes se determinó la normalidad de los datos mediante la prueba de Saphiro-Wilk. En el caso de que siguieran una distribución normal se empleó la t-Student para datos independientes y el test de Wilcoxon en el caso contrario. Para el análisis de correlaciones entre variables cuantitativas se realizó el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró una diferencia significativa aquella en el que el valor de p fuera igual o menor de 0,05.

## 5. Resultados

Durante el periodo estudiado se obtuvo una muestra de 49 pacientes con una mediana de edad de 35 días; el 63% eran varones. La mayoría de los pacientes no presentaba antecedentes de interés para el desarrollo de una bronquiolitis grave (71%). La media de gravedad de la bronquiolitis según la escala de Wood-Downes fue de 7 puntos. En el 96% de los pacientes se detectó VRS en secreciones nasales y la mayoría de los pacientes mostraba datos analíticos compatibles con infección viral. El soporte respiratorio empleado en la mayoría de los casos fue la ventilación no invasiva (76%) con una mediana de duración del soporte respiratorio de 88 horas. La evolución de los pacientes fue favorable. Precisarón una mediana de ingreso de 5 días y no falleció ningún paciente durante el estudio.

Los ingresos prolongados (más de 5 días) correspondían a pacientes de menor edad (34 vs 163 días,  $p=0,002$ ). Además, estos pacientes con ingresos más prolongados eran aquellos con menor conteo de leucocitos totales en sangre periférica ( $7.742/\mu\text{L}$  vs  $12.941/\mu\text{L}$ ;  $p<0,0001$ ). Los pacientes con antecedentes personales eran de mayor edad (209,4 vs 71,1 días,  $p=0,05$ ). El ser menor de 3 meses condicionaba ingresos más prolongados (6,3 vs 3,6 días,  $p=0,004$ ) y más horas de soporte respiratorio (126 vs 72 horas,  $p=0,002$ ).

El estudio mediante RTqPCR mostró un inmunofenotipo predominante de LTc respecto a LTh en el 87% de los pacientes, con una mediana al realizar el índice entre CD8/CD4 de 2,7.

Respecto al tipo de respuesta LTh, el análisis de INF $\gamma$  e IL-4 mostró una preferencia individual hacia el primero en el 97% de los pacientes con una mediana del índice entre ambos de 15, lo que revela una preferencia de respuesta LTh1. Al analizar el tipo de respuesta LTh a través de los receptores de quimioquinas CXCR3 y CCR4, el 97% de los pacientes mostraba una mayor expresión del segundo lo que condicionaría un tipo de respuesta LTh2. La mediana del índice entre ambos marcadores fue 0,41.

El análisis del valor de las quimioquinas y sus receptores mostró una correlación entre TARC y MDC (0,591;  $p<0,0001$ ) y entre CXCR3 y CCR4

(0,473;  $p=0,001$ ) en sangre periférica. También se encontraron correlaciones significativas entre expresión génica de CD4 con CD8 (0,336,  $p=0,021$ ), FOXP3 (0,719;  $p<0,0001$ ) e IL-4 (0,416;  $p=0,004$ ), de CD8 con FOXP3 (0,354;  $p=0,015$ ), de FOXP3 con IFN $\gamma$  (0,482;  $p=0,001$ ) e IL-4 (0,836;  $p<0,0001$ ). Los niveles de expresión de IFN $\gamma$  e IL-4 se correlacionaban entre ellos (0,676;  $p<0,0001$ ).

Los pacientes con bronquiolitis moderada según la escala de Wood-Downes fueron aquellos con mayor expresión génica de CCR4 (30,9 vs 24,6,  $p=0,002$ ), aunque este hallazgo no se encontró en sus quimioquinas específicas.

Entre los datos evolutivos destaca la relación entre los valores de TARC y MDC con la duración del ingreso y del soporte respiratorio. Valores elevados de ambos marcadores en el momento del ingreso permiten predecir ingresos más cortos que aquellos que presentan valores bajos.

Los pacientes con leucocitosis presentaban un aumento tanto en la expresión de CD4 (17,2 vs 12,1;  $p=0,041$ ) como en el valor de MIG (10.164 pg/mL vs 6.341 pg/mL;  $p=0,035$ ).

En los pacientes con sospecha o confirmación de sobreinfección bacteriana presentaban mayor expresión génica de IFN $\gamma$  (67 vs 25,6,  $p=0,04$ ).

## 6. Conclusiones

Durante una bronquiolitis aguda grave se produce una activación inmunológica caracterizada por una intensa respuesta a cargo de los LTc y un balance de LTh preferente hacia LTh1; además, los pacientes con mayor masa leucocitaria circulante en sangre periférica requieren más actividad de los LTh para el control de la homeostasis inmunitaria.

La respuesta LTh1 que aparece durante una bronquiolitis aguda se caracteriza por una mayor expresión en sangre periférica de IFN $\gamma$  que de IL-4. La mayor expresión de IFN $\gamma$  se relaciona con la posibilidad de una sobreinfección bacteriana. Sin embargo, al medir el tipo de respuesta LTh a través de receptores de quimioquinas, la expresión preferencial fue de CCR4, característico de respuestas LTh2.

El valor cuantitativo de las quimioquinas IP-10, MDC, TARC y MIG no se relaciona con la expresión de sus receptores (CXCR3 y CCR4) en sangre periférica durante una bronquiolitis aguda grave. El valor de las quimioquinas TARC y MDC en el momento del ingreso se relaciona con el pronóstico de los pacientes con bronquiolitis aguda grave al existir una relación entre estos valores y la duración del ingreso en UCIP.

# ÍNDICE

---

<b>GLOSARIO .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>13</b>
<b>1. Introducción.....</b>	<b>13</b>
<b>2. Hipótesis .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>14</b>
<b>4. Material y métodos .....</b>	<b>15</b>
<b>5. Resultados .....</b>	<b>17</b>
<b>6. Conclusiones .....</b>	<b>18</b>
<b>ÍNDICE .....</b>	<b>21</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>1. Bronquiolitis .....</b>	<b>25</b>
1.1. Definiciones.....	25
1.2 Epidemiología.....	25
1.3. Curso de la enfermedad .....	27
1.4 Tratamiento de la bronquiolitis.....	29
1.5 La respuesta inmune en la bronquiolitis.....	32
<b>2. Quimioquinas y sus receptores .....</b>	<b>41</b>
2.1 Quimioquinas .....	41
2.2 Receptores de quimioquinas.....	44
2.3 El sistema de quimioquinas y su papel biológico .....	45
<b>3. Quimioquinas y Bronquiolitis .....</b>	<b>48</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>53</b>
<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>55</b>
<b>1. Objetivo principal .....</b>	<b>55</b>
<b>2. Objetivos Secundarios.....</b>	<b>55</b>

<b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>57</b>
<b>1. Definiciones .....</b>	<b>57</b>
<b>2. Población a estudio y tamaño muestral .....</b>	<b>58</b>
<b>3. Periodo de estudio .....</b>	<b>58</b>
<b>4. Criterios de selección de pacientes .....</b>	<b>58</b>
4.1. Criterios de inclusión .....	58
4.2. Criterios de exclusión .....	59
<b>5. Desarrollo del estudio .....</b>	<b>59</b>
5.1. Captación de pacientes .....	59
5.2. Variables clínicas .....	59
5.3. Obtención y procesamiento inicial de la muestra de sangre periférica .....	60
5.4. Procesamiento y almacenaje de muestras .....	61
5.5. Procesamiento final de las muestras .....	62
<b>6. Análisis estadístico .....</b>	<b>63</b>
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>65</b>
<b>1. Análisis descriptivo .....</b>	<b>65</b>
1.1. Epidemiología, clínica, analítica y terapéutica. ....	65
1.2. Inmunofenotipo .....	69
1.3. Quimioquinas y sus receptores .....	70
<b>2. Análisis estadístico .....</b>	<b>71</b>
2.1. Variables clínicas y evolutivas .....	71
2.2. Variables analíticas y microbiológicas habituales .....	79
2.3. Inmunofenotipo .....	83
2.4. Quimioquinas y sus receptores .....	87
<b>3. Correlaciones .....</b>	<b>91</b>
3.1. Variables clínicas y analíticas habituales .....	91
3.2. Inmunofenotipo .....	96
3.3. Quimioquinas y receptores de quimioquinas .....	97



<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>99</b>
<b>1. Características clínicas y epidemiológicas.....</b>	<b>100</b>
<b>2. Respuesta inflamatoria en pacientes con bronquiolitis .....</b>	<b>104</b>
2.1 Respuesta inflamatoria .....	104
2.2 Subtipos de LT .....	106
2.3 Subtipos de LT <i>helper</i> .....	109
<b>3. Quimioquinas .....</b>	<b>113</b>
<b>4. Receptores de Quimioquinas.....</b>	<b>115</b>
<b>LIMITACIONES.....</b>	<b>119</b>
<b>LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS.....</b>	<b>123</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>125</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS .....</b>	<b>127</b>
<b>1. Figuras .....</b>	<b>127</b>
<b>2. Tablas .....</b>	<b>128</b>
<b>3. Gráficos.....</b>	<b>128</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>133</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>147</b>

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. Bronquiolitis

### 1.1. Definiciones

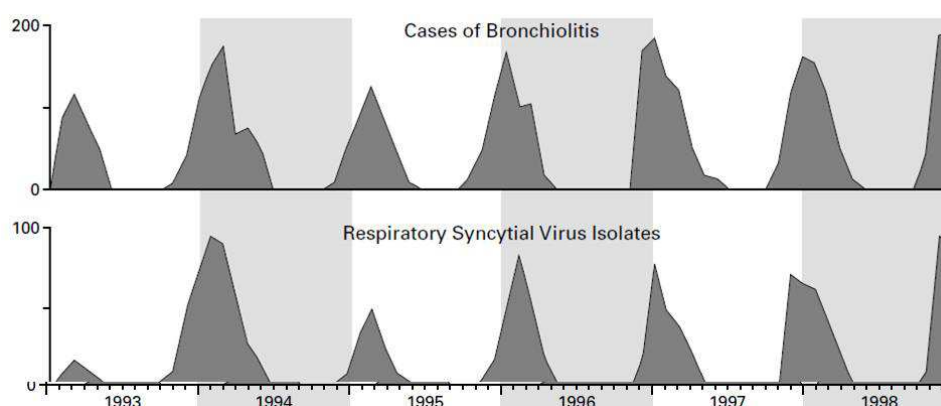
El término “bronquiolitis” remite a la enfermedad en la que, durante el curso de una infección vírica, se produce una inflamación de los bronquiolos. Esta definición hace referencia al hecho anatomopatológico que acontece durante dicha enfermedad. Sin embargo, en la práctica habitual se utiliza una definición clínica para realizar el diagnóstico de bronquiolitis<sup>1</sup>.

La definición clásica de bronquiolitis hace referencia al primer episodio de dificultad respiratoria con sibilancias, precedido por un cuadro catarral de vías respiratorias altas, que afecta a un niño menor de dos años<sup>2-4</sup>. Actualmente no existe un consenso sobre si esta dedición debe emplearse para realizar el diagnóstico de bronquiolitis, ya que hay autores que no dan tanta importancia a la edad ni al número de episodios<sup>5</sup>. Algunos autores dan preferencia al hecho de la aparición de sibilancias en el contexto de una infección viral mientras que otros se la dan a la taquipnea y a la presencia de estertores crepitantes finos o subcrepitantes en la auscultación<sup>1,6</sup>. Pese a todo, la mayoría de la producción científica actual sigue utilizando la definición clásica de bronquiolitis con el fin de que los diferentes estudios sean equiparables entre sí.

### 1.2 Epidemiología

Independientemente de la definición utilizada, la bronquiolitis constituye la infección de las vías respiratorias bajas más frecuente en los primeros años de vida; en algunas series, llega a afectar a 1 de cada 3 niños menores de dos años<sup>1,7</sup>. Entre los niños que padecen bronquiolitis, hasta un 5% precisa ingreso hospitalario, y, de éstos últimos, un 15% necesita atención en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos (UCIP)<sup>8</sup>. A nivel mundial se han calculado alrededor de 4,3 millones de ingresos al año y unos 200.000 fallecidos por esta causa<sup>9-11</sup>.

La mayoría de estos episodios acontecen en el seno de una infección por el virus respiratorio sincitial (VRS), que provoca alrededor del 80% de los episodios de bronquiolitis<sup>12</sup>. Existen otros virus que también provocan cuadros clínicos que así mismo cumplirían con la definición de bronquiolitis<sup>13</sup>. Independientemente de la localización geográfica, la epidemia de VRS, y por tanto de bronquiolitis, se produce durante los meses fríos del año (Figura 1 y 2). En España, esta epidemia ocurre entre los meses de noviembre y febrero (pico máximo en diciembre)<sup>8</sup>.



**Figura 1. Representación gráfica de sucesivas epidemias de bronquiolitis y su asociación con el VRS (Adaptado de Hall CB. *Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus*. *N Engl J Med* 2001;344:1917-28).**

Actualmente hay descritos perfiles genéticos en humanos que predisponen a sufrir una bronquiolitis a aquellos pacientes que se infectan por uno de estos virus<sup>14</sup>. Esto podría provocar que no todos los niños que se infectan por VRS o por otros virus acaban padeciendo una bronquiolitis. Se cree que la herencia de estos patrones sería poligénica ya que estudios en gemelos no han demostrado un claro patrón mendeliano<sup>15</sup>. Estos estudios llevan a pensar que variaciones génicas mínimas entre diferentes personas provocan, por un lado, una alteración en el control y adhesión del patógeno que provoca la bronquiolitis y, por otro, una respuesta inmune posterior alterada frente a esa agresión<sup>16</sup>.

Además de la susceptibilidad individual condicionada por la genética, existen diferentes factores epidemiológicos de riesgo para padecer una bronquiolitis grave como son la prematuridad, la edad menor de 3 meses o padecer

cardiopatías o neumopatías crónicas o puramente ambientales como la exposición al tabaco o la contaminación<sup>17</sup>.



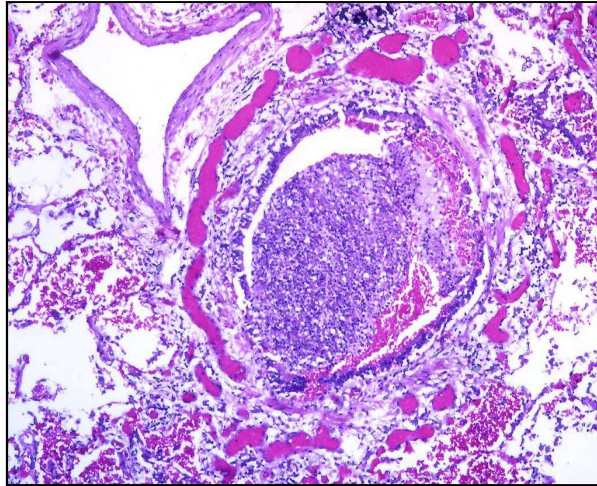
Figura 2. Distribución de la epidemia de bronquiolitis en Estados Unidos a lo largo de un año (Adaptado de *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2013;62(8):141–144).

### 1.3. Curso de la enfermedad

La bronquiolitis se desarrolla en el contexto de una infección viral. Inicialmente se produce un cuadro de inflamación en las vías respiratorias altas, que se manifiesta con aumento de la mucosidad nasal y tos para, pocos días después, afectar a las vías respiratorias bajas<sup>18</sup>.

En las vías respiratorias bajas se produce inflamación del epitelio bronquiolar con infiltración peribronquiolar de leucocitos y edema de la submucosa y la adventicia (Figura 3). Todo ello provoca la aparición de tapones de moco y necrosis del epitelio causando una obstrucción parcial o total al flujo aéreo<sup>19</sup>. La gravedad del cuadro clínico dependerá del grado de obstrucción de los bronquiolos<sup>20</sup>.

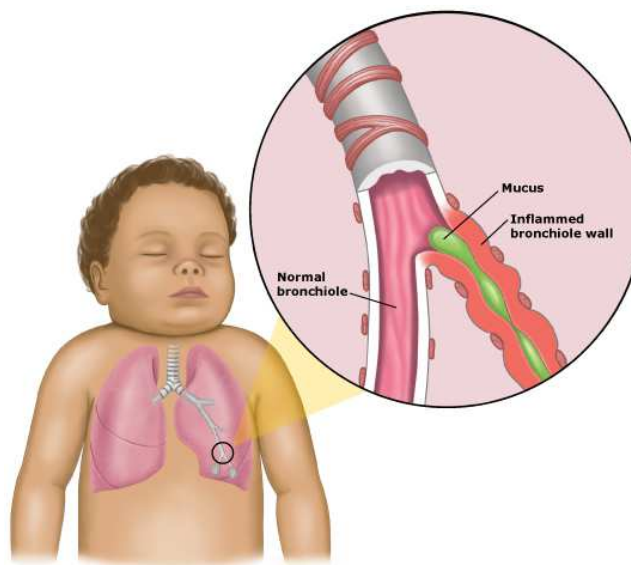
Dicha obstrucción bronquiolar se manifestará clínicamente con aumento del trabajo respiratorio, taquipnea y sibilancias y/o crepitantes en la auscultación pulmonar, siendo este el cuadro clínico típico de un lactante con bronquiolitis<sup>1</sup>.



**Figura 3. Visión microscópica del bronquiolo en cuadro de bronquiolitis aguda. Se observa infiltración leucocitaria perobronquiolar y tapón de moco central**

Esta obstrucción puede causar un mecanismo valvular que acabe provocando atrapamiento aéreo a nivel distal de las zonas obstruidas, lo que conllevaría a la aparición de atelectasias y un desajuste en la ventilación-perfusión pulmonar y en última instancia a hipoxemia<sup>5</sup> (Figura 4).

Por tanto, la broncoconstricción provocada por la musculatura lisa de los bronquiolos, que podría aparecer de forma asociada, no parece ser la clave en la fisiopatología de la bronquiolitis, lo que explicaría la pobre respuesta que tienen estos pacientes al tratamiento médico con broncodilatadores<sup>21</sup>.



**Figura 4. Representación grafica de los cambios macroscópicos en la bronquiolitis aguda, donde predomina el edema de la mucosa bronquiolar y los tapones de moco**

Con el tratamiento de soporte adecuado, la evolución de estos pacientes suele ser la curación, aunque en la mayoría de los casos el cuadro clínico puede prolongarse varias semanas, incluso después de que el agente causal inicial haya sido eliminado<sup>22</sup>. Se estima que al año fallecen unos 400 niños por bronquiolitis en Estados Unidos, la mayoría de ellos son lactantes pequeños (menores de 6 meses) y con alguna patología de base (sobre todo prematuridad y enfermedades cardiopulmonares)<sup>23</sup>.

## 1.4 Tratamiento de la bronquiolitis

La bronquiolitis ha generado multitud de estudios y publicaciones sobre los posibles tratamientos médicos y la gran mayoría de ellos llegan a la misma conclusión: casi todos son poco efectivos o no existe suficiente evidencia científica para recomendarlos<sup>21,24</sup>. De hecho, las guías clínicas de las diferentes asociaciones se renuevan cada 2-3 años y con la llegada de cada nueva edición se observa que los fármacos recomendados disminuyen y la terapia de soporte va convirtiéndose en el tratamiento estándar<sup>1,5,25-27</sup>.

### 1.3.1 Broncodilatadores

Principalmente son 3 los que han sido evaluados en muchos ensayos clínicos.

#### 1.3.1.1 Salbutamol

Tanto su presentación oral como nebulizada (esta última preferida en la práctica clínica habitual) no han demostrado ser eficaces<sup>28</sup>. Su efecto beta-adrenérgico provoca la relajación del músculo liso bronquial. En muchas ocasiones, los pediatras lo utilizan porque confunden el concepto fisiopatológico de la bronquiolitis, donde predomina el edema, con el asma, donde lo que predomina es la broncoconstricción.

En cualquier caso, el uso de salbutamol debería ser individualizado, ya que en un porcentaje de pacientes existe un cierto grado de broncoconstricción y podrían beneficiarse de este fármaco<sup>29</sup>. Por tanto, el ensayo terapéutico con este fármaco establecerá si debe ser posteriormente empleado tanto en pacientes ingresados como en aquellos que se remitan a domicilio<sup>26</sup>.

### **1.3.1.2 Adrenalina**

La vía de administración habitual es la inhalada. Además de los beneficios beta-adrenérgicos que posee (como el salbutamol) es un fármaco alfa-adrenérgico con efecto vasoconstrictor y antiedema<sup>30</sup>. Este segundo efecto es el que se ha postulado como el principal responsable de que la adrenalina nebulizada pueda presentar efectos beneficiosos respecto al placebo y el salbutamol. Sin embargo, los últimos ensayos clínicos no han demostrado beneficio respecto a la nebulización de suero salino por lo que no se recomiendan en las últimas guías clínicas<sup>1,21</sup>.

### **1.3.1.3 Bromuro de ipratropio**

El bromuro de ipratropio es un fármaco anticolinérgico y su empleo está desaconsejado en caso de bronquiolitis ya que no se ha demostrado ninguna eficacia en los estudios realizados, ya sea de forma aislada o en biterapia con salbutamol<sup>31</sup>.

### **1.3.2 Corticoides**

Los corticoides seguramente son, tras el salbutamol, los fármacos más empleados en esta patología. Y pese a que son un potente antiinflamatorio (y por tanto con efecto antiedema, hecho que predomina en la bronquiolitis)<sup>25</sup>, ningún ensayo clínico de calidad ni ninguna revisión sistemática lo recomienda, ya que no han demostrado ningún beneficio, tanto en la fase aguda de la enfermedad como en su evolución posterior, ya sean administrados por vía nebulizada como por vía sistémica<sup>32-35</sup>.

### **1.3.3 Suero salino hipertónico**

El suero salino hipertónico basa su mecanismo de acción en el hecho de que una solución hipertónica es capaz de disminuir la viscosidad del moco, estimular la movilidad ciliar, reducir el edema de la pared bronquiolar e inducir la tos<sup>36,37</sup>. Sin embargo, su empleo de forma aislada puede producir broncoespasmo (por broncoconstricción) por lo que debería combinarse con un broncodilatador. Actualmente no se recomienda su empleo puntual en pacientes que acuden al Servicio de Urgencias<sup>38</sup> pero debería considerarse en niños ingresados<sup>39-41</sup>.



### 1.3.4 Antiinfecciosos

La ribavirina es un antivírico específico contra el VRS. Pese a que inicialmente fue recomendado su empleo en casos graves de bronquiolitis asociada a VRS, desde 2003 no se emplea de forma rutinaria no solo por su alto coste, sino también por su dudosa eficacia y por la baja calidad de los ensayos clínicos que han evaluado su uso<sup>42</sup>.

El empleo de anticuerpos específicos contra VRS (palivizumab) durante la infección aguda tampoco está recomendado debido a la heterogeneidad de los ensayos clínicos llevados a cabo y el pequeño tamaño muestral de éstos, lo que no ha permitido desarrollar ningún metaanálisis por el momento<sup>43</sup>; a esto hay que sumar el elevado coste económico de esta medicación.

Por otro lado, los antibióticos no están recomendados de forma sistemática debido a la baja probabilidad de una infección bacteriana concomitante al cuadro de bronquiolitis. Su empleo debe reservarse para los casos de bronquiolitis con sospecha de sobreinfección bacteriana<sup>44</sup>.

### 1.3.5 Tratamiento ante el fracaso respiratorio

Cuando el empleo de los fármacos anteriormente descritos no es suficiente para paliar la sintomatología de la bronquiolitis, los pacientes acaban desarrollando un fracaso respiratorio manifestado como hipoxemia y/o dificultad respiratoria grave.

En estos casos se hace imprescindible el soporte respiratorio, el cual en muchos casos acaba siendo el único tratamiento eficaz en esta enfermedad.

En el caso de que aparezca hipoxemia, ésta debe ser tratada con oxígeno suplementario<sup>45</sup>. En el caso de que la oxigenoterapia simple con gafas nasales fracase, será necesario recurrir a la ventilación mecánica, ya sea en su forma no invasiva como invasiva. No existe actualmente ningún estudio que establezca qué modalidad es mejor, pero parece razonable iniciar el soporte respiratorio con las modalidades menos invasivas (oxigenoterapia de alto flujo o CPAP) y reservar la ventilación mecánica para las formas más graves o aquellas en las que hayan fracasado las anteriores<sup>46</sup>.



En caso de que todo lo anterior falle, se podría recurrir a la ventilación de alta frecuencia<sup>47</sup> o incluso a la oxigenación por membrana extracorpórea<sup>48</sup>.

Mención aparte habría que realizar del surfactante pulmonar. Esta medicación es un agente tensoactivo que consigue estabilizar el alveolo al disminuir la tensión superficial de éste. Además, los surfactantes tipo A y D han demostrado tener acciones antivíricas. Bajo estas premisas, el surfactante podría ser un fármaco ideal para ser empleado en la bronquiolitis. Sin embargo, para su administración se requiere que el paciente esté intubado y, además, su coste económico es muy elevado. Por tanto, su empleo debería individualizarse y reservarse a los pacientes con fracasos respiratorios más graves<sup>49</sup>.

El óxido nítrico también se ha empleado en pacientes con bronquiolitis grave en base a su efecto vasodilatador pulmonar, sin demostrar ninguna eficacia<sup>50</sup>.

Finalmente, el HélioX (una mezcla de helio y oxígeno a una concentración prefijada) basa sus efectos en su menor densidad que el aire. Ha sido empleado en diversas patologías obstructivas con diferente eficacia, ya que mejora el intercambio gaseoso en el alveolo. En cuanto a la bronquiolitis, el Heliox ha demostrado en los ensayos clínicos en los que ha sido evaluado que disminuye la puntuación en las escalas empleadas para evaluar la gravedad de la bronquiolitis sin que, por ello, dicha reducción tenga un impacto clínico significativo (días de ingreso, intubación...) <sup>51</sup>.

### 1.3.6 Fisioterapia respiratoria

La fisioterapia basa su efecto respiratorio en la ayuda a la eliminación de secreciones y con ello a una menor tasa de atelectasias en los pacientes con esta patología<sup>52</sup>. Pese a que es un tratamiento ampliamente empleado en pacientes con bronquiolitis, su empleo debe desaconsejarse ya que los estudios que se han llevado a cabo no han demostrado que varíe el curso clínico de la enfermedad y en ocasiones podría hacer que empeorasen<sup>53</sup>.

## 1.5 La respuesta inmune en la bronquiolitis

Estudios realizados hasta la fecha sugieren que las manifestaciones clínicas y la gravedad de la bronquiolitis no depende en sí misma del microorganismo

que la provoque sino del daño que éste genere en el pulmón. Una parte de ese daño dependerá de que el paciente presente diferentes factores de riesgo, pero además influirá en gran medida la respuesta inmunológica que desarrolle el huésped frente a la infección<sup>54</sup>. Como sucede en otro tipo de infecciones graves, una respuesta inmunológica desmesurada y/o inapropiada frente al agente causal provocaría cuadros clínicos de mayor gravedad. Por ejemplo, en pacientes que padecen una sepsis está demostrado que una pérdida de balance entre mecanismo proinflamatorios y antiinflamatorios provoca daños irreparables en los tejidos, lo que contribuiría en gran manera al fallo multiorgánico que se produce<sup>55</sup>. De forma parecida, se ha observado que, entre los neonatos pretérminos, las sepsis de mayor gravedad son las de aquellos que estuvieron expuestos intraútero a una corionioamnionitis, lo que reprogramaría su respuesta a una infección tras el parto<sup>56</sup>.

Durante el cuadro clínico de bronquiolitis, la respuesta inmunológica se caracteriza en primer lugar por el reconocimiento del tejido dañado por el virus por células del sistema inmune, y posteriormente por un reclutamiento de un grupo específico de leucocitos para reparar el tejido dañado. Una vez que los leucocitos han infiltrado el tejido dañado, éstos tratan de eliminar la causa que provocó el daño inicial desbridando así el tejido con el fin de repararlo a un estado de normalidad anatomopatológica<sup>57</sup>. Pero cuando se produce una respuesta inmunológica excesiva o inapropiada, las propias células del sistema inmune perpetúan y aumentan el daño inicial y por tanto la gravedad del cuadro clínico.

### **1.5.1 Respuesta inmune innata durante la bronquiolitis**

La respuesta innata es la primera línea de defensa durante una infección. Este tipo de respuesta no es específica, por lo que no requiere de contacto previo con el patógeno para llevarse a cabo. Esta respuesta consta de varios mecanismos tanto celulares como bioquímicos<sup>58</sup>.

Sus principales componentes son las barreras físicas, las células fagocíticas (neutrófilos, eosinófilos, macrófagos), células dendríticas y linfocitos *natural killer*, proteínas sanguíneas (incluidos miembros del complemento) y citoquinas.

Esta respuesta inmunológica temprana tiene lugar en las células epiteliales donde el virus ha interactuado con ellas, lo que da lugar a la secreción de citoquinas las cuales defienden al huésped de diferentes formas (inhiben la replicación viral, provocan la apoptosis celular de las células infectadas, atraen a otras células del sistema inmune desde la circulación periférica, etc...).

Esta primera línea de defensa trata de contener la infección en sus primeras fases, intentando evitar que ésta progrese a estadios más avanzados o de mayor gravedad, mientras la inmunidad adaptativa se desarrolla.

En la bronquiolitis, los virus se adhieren e infectan las células del epitelio de la vía aérea, lo que inicia la cascada inflamatoria. En un primer momento, las células que son atraídas al pulmón no muestran especificidad por el virus y en su mayoría son neutrófilos. Estos son capaces de segregar citoquinas que atraen a macrófagos y a más neutrófilos junto a otras células, que posteriormente darán lugar a la respuesta adaptativa<sup>59</sup>. Muchas de estas células segregan citoquinas con actividad antiviral como los interferones del Tipo I (IFN- $\alpha/\beta$ )<sup>60</sup>. Además, los virus que provocan la bronquiolitis son capaces de activar al receptor de membrana tipo Toll 4 (TLR4) el cual activa a las células *natural killer*.

Sin embargo, la respuesta inmune innata no desempeña un rol importante durante la defensa de una infección como la bronquiolitis ya que la mayoría de los virus que la provocan han desarrollado mecanismos para evadirla, tales como disminuir la cantidad de INF- $\alpha/\beta$  que es segregado en respuesta al virus<sup>54</sup>.

### 1.5.2 Respuesta inmunológica adaptativa durante la bronquiolitis

Debido a que la respuesta innata no resulta efectiva para controlar en primera instancia al agente causal de la bronquiolitis, son necesarios otros mecanismos que finalmente eliminen al virus del organismo. La inmunidad adaptativa consigue una respuesta específica y dirigida contra el patógeno que inició el cuadro infeccioso.

La inmunidad adaptativa se lleva a cabo a través de una respuesta humoral (segregando inmunoglobulinas específicas)<sup>61</sup> y una celular (a través de células

que reconocen específicamente a las células infectadas por el virus y lo destruyen)<sup>62</sup>.

Pese a que la inmunidad adaptativa podría parecer la solución final a un proceso infeccioso, en ocasiones no es tan efectiva como se desearía. Acontece días después de que el virus infecte la vía respiratoria, tanto en casos de primoinfección como en las reinfecciones (éstos últimos debido al periodo ventana que ocurre entre la infección viral y el tiempo necesario para activar a los linfocitos con memoria inmunológica que se crearon durante la primoinfección). Pero además, como veremos más adelante, requiere de un balance perfecto entre células efectoras y aquellas que las controlan para no provocar un exceso de daño a los tejidos<sup>63</sup>.

#### ***1.5.2.1. Respuesta inmunológica adaptativa humoral***

La respuesta humoral que se produce tras una primoinfección daría lugar a la producción de anticuerpos específicos contra el patógeno que provocó la bronquiolitis. La célula que se encarga de producir estos anticuerpos es el linfocito B. Esta respuesta es generalmente tardía, por lo que no desempeña un rol importante en los casos de un primer contacto con un virus<sup>61</sup>.

Este tipo de respuesta inmunológica se realiza a través de inmunoglobulinas específicas frente al virus que provoca la infección<sup>64</sup>.

La primera inmunoglobulina que se produce es IgM. En general se detecta a los 5 días de la infección, aunque puede tardar más en aparecer en función de la edad del paciente. Estos anticuerpos son detectables hasta tres meses después en pacientes que han sufrido una bronquiolitis.

Posteriormente, en torno a los 20-30 días, se empieza a producir IgG. Sus títulos persisten hasta un año después de la infección, momento en el que se hacen prácticamente indetectables. En el caso de que se produjera una reinfección, los niveles de IgG aumentarían rápidamente en los 5 días posteriores a la reinfección debido al efecto *booster*, supliendo así a la IgM.

La producción de IgA ocurre de forma bifásica; en primer lugar y de forma rápida se produce IgA en las secreciones nasales del paciente con un pico en el título de estos anticuerpos a los 10 días de la infección. Sin embargo, la

producción de IgA sérica puede incluso retrasarse más allá de un mes. Pese a que se debe esperar la presencia de IgA de forma temprana en las secreciones nasales, en numerosas ocasiones la producción de IgA no llega a producirse nunca<sup>65</sup>.

Finalmente, la IgE no desempeña un rol importante en la defensa inicial frente a los virus que provocan bronquiolitis, pero se cree que interviene en la aparición posterior de episodios recurrentes de sibilancias transitorias/asma por inmunidad cruzada con otros alérgenos<sup>64</sup>.

También se sabe que, cuanto más pequeño es el paciente, menor es la producción de inmunoglobulina, lo que daría lugar a títulos bajos de todas las clases de inmunoglobulinas. Esto hace que la función de este tipo de defensa en la bronquiolitis sea limitado. En esto se basa la profilaxis con inmunoglobulinas específicas contra el VRS (Palivizumab) que se emplea en recién nacidos prematuros<sup>66</sup>.

En resumen, el papel de las inmunoglobulinas en un primer episodio de bronquiolitis es poco importante debido al retraso natural en su producción en casos de primoinfección.

### *1.5.2.2 Respuesta inmune adaptativa celular*

A diferencia de la inmunidad adaptativa humoral, donde los linfocitos B son los efectores de la respuesta través de inmunoglobulinas, la inmunidad adaptativa celular se lleva a cabo a través de los linfocitos T<sup>67</sup>. El linfocito T se caracteriza por expresar de forma constitutiva el receptor de membrana CD3, además de expresar diferentes receptores de antígeno que le permite reconocer al germen responsable de la infección. La presencia de CD3 en su membrana celular permite diferenciarlos de otros tipos de leucocitos.

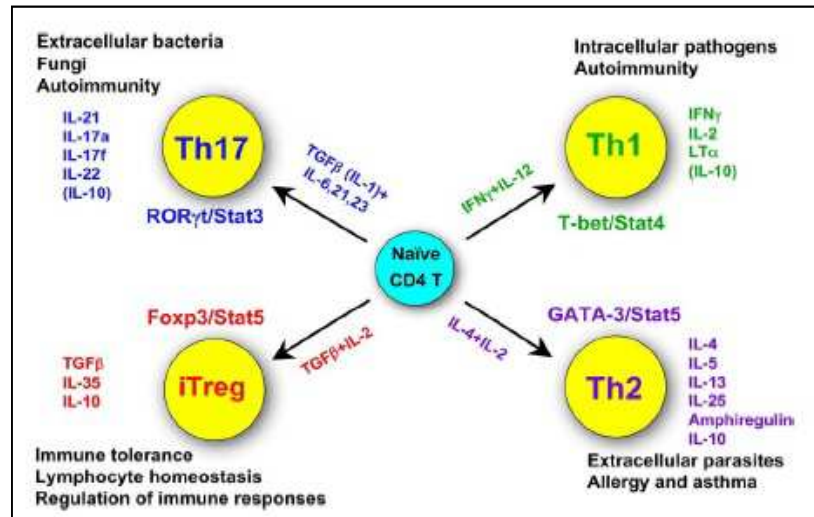
Existen diferentes tipos de linfocitos T y cada uno realiza una función diferente. Debido a que la respuesta a cargo de linfocitos T es una respuesta específica se requiere que el huésped haya estado en contacto con el antígeno previamente. Por tanto, este tipo de respuesta, en el caso de primoinfección, requiere de al menos unos días para hacerse totalmente efectiva.

Los linfocitos T citotóxicos (LTc) forman uno de los subtipos celulares de los LT. Se caracterizan por expresar, además de CD3, el receptor de membrana CD8. La función de estos linfocitos es reconocer antígenos presentados en moléculas HLA de clase I, como es el caso de las células presentadoras de antígeno y de las células infectadas por virus, con el fin de destruir dichas células. Pero, a diferencia de la inmunidad innata celular, los LTc dirigen su respuesta de manera específica contra células que están infectadas, las cuales expresan en su superficie un antígeno que es reconocido por el LTc. Tras este reconocimiento, los LTc segregan proteínas que inducen la muerte celular. Además, el LTc provoca la expansión clonal de sí mismo, lo que produce que la respuesta inmune a cargo de estas células sea más efectiva y específica contra un patógeno concreto. La producción de LTc está estimulada entre otras citoquinas por Interferón  $\gamma$  (INF $\gamma$ ) que está producido por otro subtipo de LT<sup>68</sup>.

Debido a que los patógenos que provocan bronquiolitis son patógenos intracelulares, los LTc desempeñan un rol importantísimo en la defensa contra este tipo de infecciones. Sin embargo, muchos de estos virus son capaces de modular de forma negativa los LTc, impidiendo que se produzca este tipo de respuesta, o al menos en menor medida de la esperada. Se cree que este efecto lo consiguen inhibiendo la producción de IFN $\gamma$ <sup>69</sup>, lo que daría lugar a una persistencia del virus en las vías respiratorias<sup>70</sup>. Sin embargo, existen estudios en los que se ha observado que, en pacientes con cuadros graves de bronquiolitis, existe, por el contrario, una activación excesiva de los LTc<sup>71</sup>.

Otro grupo de linfocitos T que intervienen en la inmunidad adaptativa son los linfocitos T colaboradores o *helper* (LTh). Comparten con los LTc la expresión de CD3, pero además expresan de forma diferencial CD4. Estos linfocitos segregan citoquinas en respuesta a una infección, lo que provoca la activación específica de algunas células del sistema inmune, en función del patógeno y del tipo de célula que se necesite para eliminarlo. Por tanto, los LTh defienden de las infecciones activando a otras células para que éstas eliminen microbios. Al igual que los LTc, los LTh responden ante la presencia de antígenos ya conocidos, lo que provoca que la respuesta inmune sea específica<sup>72</sup>.

Se sabe que la proporción de LTh/LTc en sangre periférica de un individuo sano es de 2:1. Dependiendo de qué tipo de respuesta inmune se requiera, los LTh pueden desarrollarse en diferentes subtipos dependiendo de las citoquinas que segreguen (Figura 5).



**Figura 5.** Representación de los diferentes tipos de linfocitos CD4 (LTh) y las citoquinas que producen (Adaptado de Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;112:1557-69).

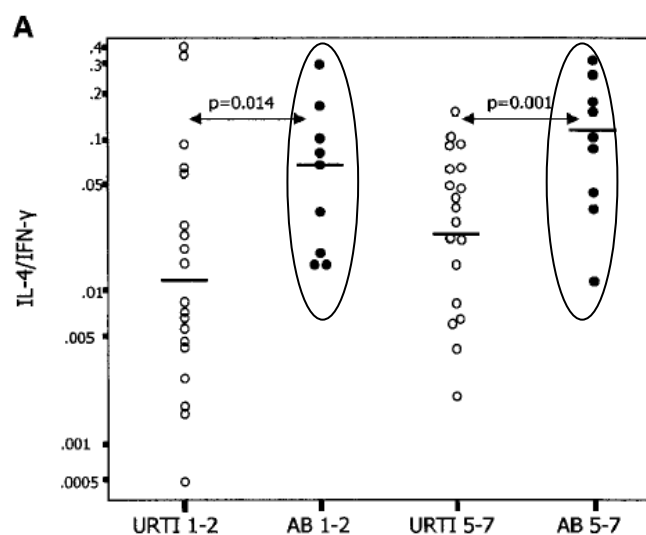
El primer tipo de LTh son los linfocitos T colaboradores 1 (LTh1) y desempeñan un rol importante en la defensa de infecciones intracelulares, ya que segregan citoquinas que estimulan a los linfocitos B para que segreguen IgG que opsonice a microbios que posteriormente serán fagocitados por los macrófagos y también a los linfocitos T citotóxicos que ejercen su función de manera directa. Esta función la realiza el LTh1 principalmente a través de su citoquina específica, el IFN $\gamma$ <sup>73</sup>.

El segundo tipo de LTh son los linfocitos T colaboradores 2 (LTh2). Estos linfocitos segregan principalmente interleuquina 4 (IL-4), que ejerce su función estimulando al eosinófilo y al linfocito B para que produzca IgE. A través de estos dos mecanismos, los LTh2 actúan en la defensa de infecciones contra parásitos extracelulares y en las reacciones alérgicas<sup>74</sup>.

Aunque en las infecciones ambos tipos de respuesta pueden estar presentes de manera simultánea, en general existe una polarización hacia uno de los dos tipos, dependiendo del tipo de infección o enfermedad a la que se enfrenta el

huésped. En caso de ser necesaria la defensa contra una infección intracelular, la polarización se realiza a través de LTh1, mientras que en el caso de infección por parásitos extracelular o procesos alérgicos se realiza a través de LTh2. Por tanto, el balance Th1/Th2 es importante a la hora de evaluar cómo se está comportando el sistema inmune durante una bronquiolitis<sup>63</sup>.

Debido a esto, los virus que provocan bronquiolitis deberían producir una respuesta balanceada hacia LTh1, ya que son este tipo de células las que nos defienden de infecciones intracelulares. Sin embargo, existen estudios que han demostrado que en las bronquiolitis graves este tipo de respuesta está polarizada hacia LTh2<sup>75</sup>.



**Figura 6. Cociente IL4/IFN $\gamma$  en pacientes con catarros de vías altas y con bronquiolitis (columna con enmarcada con círculo) a los 1-2 y 5-7 días de la infección. Se observa una predominancia del balance hacia IL-4, y consecuentemente hacia LTh2 en pacientes con bronquiolitis (Adaptado de Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. *Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:633-9).**

Esto pone de manifiesto que el tipo de respuesta inmunológica frente a una infección puede contribuir a que el curso de la enfermedad sea más o menos grave. Se cree que existen diferentes mecanismos por los que, en las bronquiolitis, la respuesta de linfocitos T colaboradores se polariza hacia LTh2. Algunos estudios han demostrado una producción deficiente de IFN $\gamma$  frente a IL-4 en pacientes con bronquiolitis, lo que polariza la respuesta hacia LTh2<sup>76-78</sup>;



en estos estudio se observó que aquellos pacientes que presentaban una bronquiolitis tenían un balance INF $\gamma$ /IL-4 a favor de esta última comparado con pacientes con catarros de vías altas (Figura 6).

Además de los clásicos LTh1 y LTh2, en los últimos 10 años se han descubierto otros linajes celulares CD4 como son los LTh17<sup>79</sup> y los LTreg<sup>80</sup>.

Los LTh17 están relacionados con la defensa contra infecciones bacterianas y hongos además de participar o contribuir en enfermedades autoinmunes. Los LTh17 producen numerosas citoquinas entre las que IL-17a es la más característica<sup>81</sup>.

Los LTh reguladores (LTreg) modulan la respuesta inmune ejerciendo un control sobre el resto de leucocitos. Están caracterizados por expresar CD4 y CD25 pero, sobre todo, por la expresión de FOXP3; este gen, aunque presente en menor medida en otras líneas celulares, es prácticamente exclusivo de los LTreg<sup>80</sup>. Los LTreg están encargados de controlar la forma en que actúan los LTh, evitando su activación descontrolada, lo que podría ser la causa de una enfermedad autoinmune o de una mala respuesta contra un patógeno; por ejemplo, se ha observado en ratones que la estimulación de los LTreg previene la enfermedad injerto contra huésped<sup>82</sup>.

El papel de LTh17 y LTreg ha sido poco estudiado hasta la fecha en relación a enfermos de bronquiolitis. Recientemente se ha publicado que el balance entre ambas líneas celulares puede tener un papel importante en el desarrollo de una infección grave por VRS<sup>83,84</sup>. Además, se ha observado que aquellos niños que presentaban menor número de LTreg en sangre periférica padecían infecciones por VRS más graves<sup>85</sup>.

## 2. Quimioquinas y sus receptores

### 2.1 Quimioquinas

Las quimioquinas son un grupo de citoquinas que desempeñan un rol fundamental en el reclutamiento y migración de leucocitos al lugar donde éstos son necesarios<sup>86</sup>. De la conjunción de su función procede su nombre: “citoquina quimiotáctica”. Intervienen en una amplia gama de procesos tanto fisiológicos (en los órganos primarios y secundarios linfoides, donde se realizaría la diferenciación a leucocitos más especializados), como en situaciones patológicas (guiando a esos leucocitos especializados a los tejidos donde se requiere que ejerzan su función). Haciendo referencia a una de estas condiciones podríamos hablar de quimioquinas homeostáticas y proinflamatorias<sup>87</sup>.

Las quimioquinas son moléculas pequeñas (8-12 kDa) polipeptídicas formadas por una sola cadena de unos 70 aminoácidos, reunidas en una familia de aproximadamente 50 proteínas. Dentro de esta cadena de aminoácidos existen 4 residuos de cisteína que se unen entre ellos por puentes disulfuro<sup>88</sup>.

Dependiendo del número de residuos de cisteína en el extremo N-terminal y su relación entre ellos, las quimioquinas se clasifican en 4 subfamilias<sup>89</sup>:

- 1) Subfamilia CXC ( $\alpha$ -quimioquinas): un aminoácido separa los dos primeros residuos de cisteína.
- 2) Subfamilia CC ( $\beta$ -quimioquinas): los dos primeros residuos de cisteína se encuentran adyacentes.
- 3) Subfamilia CX3C ( $\delta$ -quimioquinas): tres aminoácidos separan los dos primeros residuos de cisteína.
- 4) Subfamilia C ( $\gamma$ -quimioquinas): a diferencia de las anteriores, solo posee dos residuos de cisteína, por lo que estructuralmente solo presenta un puente disulfuro.

Inicialmente, las quimioquinas adquirieron su nombre basándose en la respuesta inmunológica que provocaban. Actualmente existe una nomenclatura internacional que hace referencia a la estructura molecular de las quimioquinas y a qué familia pertenece. Cada quimioquina lleva el nombre de la subfamilia a

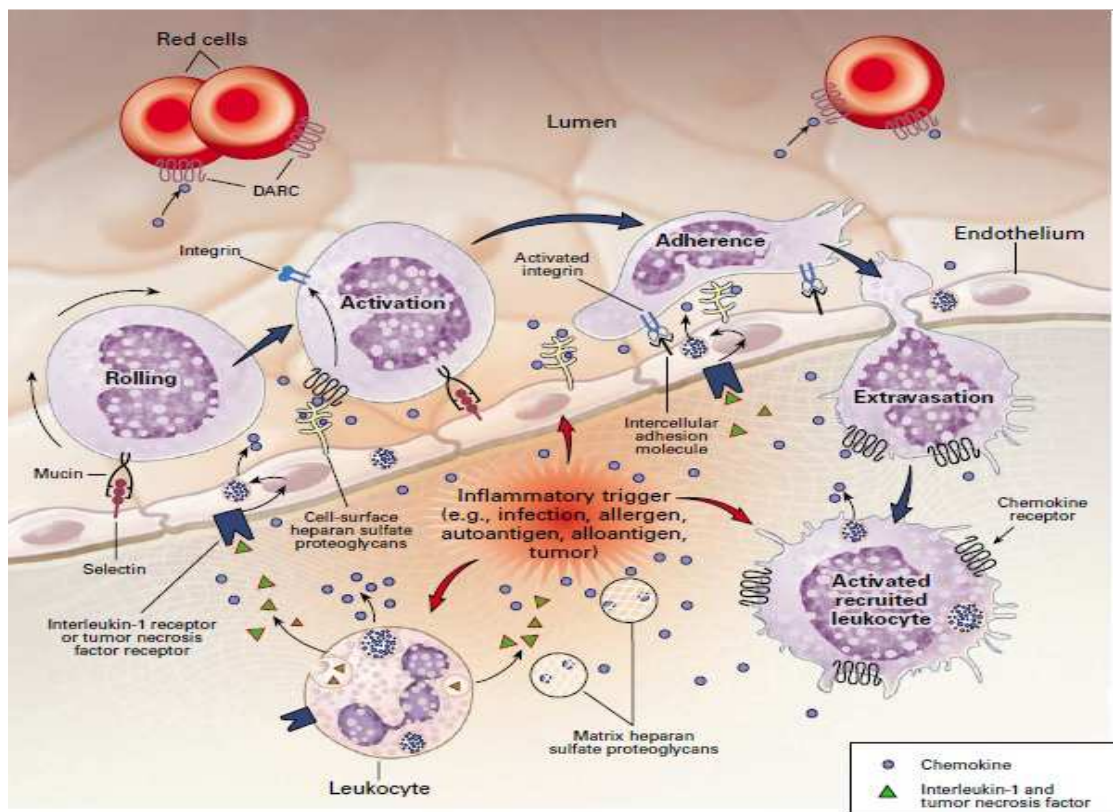
la que pertenece (CXC, CC,...), seguido de la letra L (de ligando) y un número (este número corresponde a la posición que ocupa el gen que codifica la quimioquina dentro del cromosoma). Además de la nomenclatura internacional (ej. CXCL8) muchas quimioquinas poseen el nombre que se les otorgó al ser descubiertas (ej. CXCL8 = IL-8). Este hecho hace que en algunos artículos se hable de las quimioquinas con su designación internacional mientras que en otras publicaciones, en cambio, se haga referencia a ellas con el nombre clásico<sup>90</sup>.

Las familias CC y CXC son claramente más amplias que las familias C y CX3C (estas dos familias juntas solo constituyen 3 quimioquinas del total)<sup>91,92</sup>. Todas las células del sistema inmune pueden ser atraídas por alguna quimioquina, de hecho existe en muchas ocasiones un solapamiento y redundancia entre la acción de diferentes quimioquinas. De modo genérico, las quimioquinas de la familia CC atraen a monocitos, eosinófilos y basófilos, mientras que las de la familia CXC reclutan a neutrófilos. Ambas familias son capaces de reclutar linfocitos a través de alguna de sus quimioquinas. Este hecho hace que, en conjunto, el sistema de quimioquinas en ocasiones no sea específico a la hora de reclutar células inmunes a un tejido determinado<sup>87,88</sup>.

Las quimioquinas son producidas por los leucocitos y por algunas células tisulares (células endoteliales, células epiteliales y fibroblastos)<sup>88</sup>. La producción de estas quimioquinas depende de varios estímulos, como la exposición a moléculas antigénicas microbianas (como podrían ser partículas víricas) o la exposición a interleuquinas. La mayoría de las quimioquinas son inducidas por citoquinas proinflamatorias (tales como TNF o IL-1) y otras lo hacen de forma específica cuando se exponen a IFN $\gamma$ . En contraposición, hay citoquinas que inhiben la producción de quimioquinas como la citoquina antiinflamatoria IL-8<sup>87</sup>.

Las quimioquinas desempeñan un rol fundamental como atrayentes de las células del sistema inmune, regulando el tráfico leucocitario hacia los órganos y tejidos donde son necesarios, ya sea para regular procesos homeostáticos (como la entrada de los leucocitos a los ganglios linfáticos y su retorno posterior al torrente sanguíneo) o inflamatorios (atracción de los leucocitos

hacia tejidos donde van a provocar una respuesta inflamatoria). En este proceso, conocido en inglés como *trafficking*, también intervienen otras proteínas como las selectinas, integrinas, moléculas de adhesión, citoquinas y metaloproteasas (Figura 7)<sup>93</sup>, pero son las quimioquinas las que consiguen que esta adhesión y extravasación de los leucocitos del torrente sanguíneo se realice con alta afinidad<sup>86</sup>. La mayoría de las quimioquinas se encuentran unidas al endotelio a través de proteoglicanos, aunque algunas de ellas se liberan y circulan por el torrente sanguíneo<sup>94</sup>.



**Figura 7. Diapédesis leucocitaria y la participación de las quimioquinas en este proceso (Adaptado de Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 1998;338:436-45).**

Por tanto, las quimioquinas son un potente estímulo atrayente para la mayoría de las células del sistema inmune (neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monocitos, mastocitos, células dendríticas, células NK y linfocitos T y B) y convierten las uniones de baja afinidad con las selectinas en uniones de alta afinidad<sup>94</sup>. Dependiendo de cuál sea la célula del sistema inmune que se precise para llevar a cabo una respuesta concreta, a nivel local se segregarán unas quimioquinas u otras para atraer hacia el tejido deseado unas células

determinadas, ya que no todas las células del sistema inmune son capaces de reconocer todas las quimioquinas. Es decir, muestran cierto grado de especificidad<sup>88</sup>.

El esquema de la Figura 8 representa las diferentes familias de quimioquinas y las quimioquinas que pertenecen a ellas, así como los receptores a los que éstas se unen y en qué células inmunitarias se encuentran dichos receptores.

Family	Chromosome	Chemokine	Receptor	Main leukocyte targets
		Old name	New name	
CXC	4q13-q21	IL-8	CXCL8	PMN
	4q21	GCP-2	CXCL6	
	4q12-q13	NAP-2	CXCL7	PMN
		ENA-78	CXCL5	
		GRO $\alpha$	CXCL1	
		GRO $\beta$	CXCL2	
	4q21	GRO $\gamma$	CXCL3	Th1, NK
		PF4	CXCL4	
		IP-10	CXCL10	
		Mig	CXCL9	
	4q21.2	I-TAC	CXCL11	Widespread
	10q11.1	SDF-1 $\alpha/\beta$	CXCL12	
	4q21	BCA-1	CXCL13	
	17p13		CXCL16	
	5q31	BRAX	CXCL14	Unknown
	17q11.2	MCP-1	CCL2	Mo, NK, Ba, iDC, T act, B
		MCP-4	CCL13	
		MCP-3	CCL7	
		MCP-2	CCL8	
	17q12	MIP-1 $\beta$	CCL4	Mo, M $\phi$ , Th1, T act, NK
	17q11	MIP-1 $\alpha$ S	CCL3	
	17q11.2	MIP-1 $\alpha$ P	CCL3LI	
	17q12	RANTES	CCL5	
CC	17q12	MPIF-1	CCL23	Mo, M $\phi$ , iDC, NK
	17q11.2	HCC-1	CCL14	
		HCC-2	CCL15	
		HCC-4	CCL16	
	17q21.1	Eotaxin	CCL11	Eo, Ba, Th2
	7q11.23	Eotaxin-2	CCL24	
		Eotaxin-3	CCL26	
	16q13	TARC	CCL17	iDC, Th2, NK, T skin,
	2q33-q37	MDC	CCL22	
		MIP-3 $\alpha$	CCL20	
	9p13	ELC	CCL19	mDC, M $\phi$ , T naive, T act
	17q12	SLC	CCL21	
		I-309	CCL1	Mo, iDC, th2, T req
	19p13.2	TECK	CCL25	
	9p13	CTACK	CCL27	T act, T muc, T skin
	17q11.2	MEC	CCL28	
		PARC	CCL18	mDC, T naive
XC	1q23	Lymphotactin	XCL1	T, NK
CX <sub>3</sub> C	16q13	SCM-1 $\beta$	XCL2	Mo, iDC, NK, Tc1, Th1
		Fractalkine	CX3CL1	

Figura 8. La familia de las quimioquinas. Diferentes tipos, familias y receptores (Adaptado de Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. *Chemokines and chemokine receptors: an overview. Front Biosci* 2009;14:540-51).

## 2.2 Receptores de quimioquinas

Las quimioquinas realizan su función al unirse a uno de los 19 receptores de quimioquinas. Estos receptores presentan una estructura caracterizada por siete dominios transmembrana que se encuentran acoplados a la proteína G<sup>95</sup>.



Una vez que una quimioquina se une a su receptor, se produce una respuesta intracelular activadora que finalmente produce cambios en el citoesqueleto así como en las fibras intracelulares de actina y miosina, lo que provoca un aumento en la motilidad celular. Además, las quimioquinas inducen la expresión de integrinas, lo que condiciona uniones intercelulares más fuertes, lo que también genera una mayor migración leucocitaria<sup>96</sup>.








Los receptores de quimioquinas llevan el nombre de la subfamilia de quimioquinas a las que se unen (CXC, CC,...), seguido de la letra R (de receptor) y un número (ej. CXCR1). El número de la quimioquina no coincide necesariamente con el número del receptor de quimioquinas al que se une<sup>97</sup>.

Como ya se ha comentado con anterioridad, el sistema de quimioquinas muestra cierto grado de especificidad. Todos los leucocitos expresan receptores de quimioquinas pero no todos los leucocitos expresan los mismos receptores. Esto hace que no todas las células del sistema inmune sean capaces de reconocer a todas las quimioquinas; de este modo, existen diferentes patrones de migración en función de lo que sea necesario en ese momento. Los linfocitos tipo T son los que expresan más diversidad de receptores de quimioquinas<sup>88</sup>.

### 2.3 El sistema de quimioquinas y su papel biológico

De forma constitutiva y en condiciones no patológicas, las quimioquinas son sintetizadas y segregadas en los tejidos linfáticos (ganglios, timo, médula ósea). La presencia de quimioquinas en estos órganos es el estímulo definitivo que necesitan los leucocitos inmaduros para abandonar el torrente sanguíneo e infiltrar estos tejidos donde finalizan su maduración. Por eso, a estas quimioquinas se las conoce como homeostáticas<sup>89</sup>. La mayoría de dichas quimioquinas homeostáticas se expresan de forma constitutiva en los órganos linfoides. En 1998, Nakano et al. reconocieron mutaciones en ratones que darían lugar a fallos en la expresión de alguna quimioquina, dando lugar a la depleción o la no migración de un grupo de leucocitos a estos órganos<sup>98</sup>. Esto pone de manifiesto la importancia de las quimioquinas en el *trafficking* leucocitario.

Además de esa función homeostática, la secreción de quimioquinas es inducida en multitud de procesos inflamatorios, ya sea en respuesta a una infección o como consecuencia de enfermedades autoinmunes. Esto provoca la migración, acumulación y activación de leucocitos en un determinado tejido. Como ya se ha comentado, dependiendo del patrón de quimioquinas secretado se reclutará un tipo de leucocitos u otro. Este tipo de quimioquinas son las llamadas inflamatorias y están implicadas en enfermedades inflamatorias, infecciosas y tumorales<sup>86</sup>.

Inflammatory Disease	Infiltrate	Chemokine
	Neutrophil	Interleukin-8; GRO- $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ; ENA-78
	Eosinophil, T cell, monocyte, basophil	MCP-1, -4; MIP-1 $\alpha$ ; eotaxin; RANTES
	Neutrophil	Interleukin-8, ENA-78
	T cell, monocyte	IP-10
	Monocyte, T cell, neutrophil	MCP-1, RANTES, IP-10
	Monocyte, neutrophil	MIP-1 $\alpha$ , MCP-1, interleukin-8, ENA-78
		MIP-1 $\beta$
	T cell, monocyte	MCP-1, -4; IP-10
	Monocyte, neutrophil, T cell, eosinophil	MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , eotaxin, IP-10, interleukin-8
	T cell, neutrophil	MCP-1, IP-10, MIG, GRO- $\beta$ , interleukin-8
	Neutrophil, monocyte	Interleukin-8; GRO- $\alpha$ ; MCP-1; MIP-1 $\alpha$ , -1 $\beta$
	T cell, monocyte	MCP-1, IP-10

El principal estímulo para la secreción de quimioquinas inflamatorias es la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 y TNF alfa), así como la presencia de virus y bacterias en un tejido. Otros estímulos importantes son la producción de IFN $\gamma$  e IL-4 a cargo de LTh1 y LTh2 respectivamente<sup>99</sup>.

Debido a que las quimioquinas se producen de manera local (tanto en el endotelio vascular como en los propios tejidos), la concentración de estas sustancias es menor en el torrente sanguíneo. Sin embargo, hay estudios que han demostrado que existe una relación entre la cantidad de quimioquinas en sangre periférica u su valor en fluidos (secreción bronquial, líquido cefalorraquídeo...) <sup>100-102</sup>.

**Figura 9. Ejemplos de diferentes enfermedades y su relación con quimioquinas (Adaptado de Luster AD. *Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. N Engl J Med 1998;338:436-45*).**

En todas las enfermedades donde predomina la inflamación, ya sea ésta de causa infecciosa o no, existe un infiltrado leucocitario en el tejido afectado que caracteriza la enfermedad. Esta

acumulación específica de leucocitos en estos tejidos se debe, entre otros factores, a la expresión determinada de unas quimioquinas u otras<sup>86</sup>.

Por tanto, el infiltrado leucocitario de un órgano durante una enfermedad es específico de dicha enfermedad y viene condicionado en parte por el patrón de quimioquinas expresadas en dicho tejido (Figura 9). Ejemplos de esta teoría son patologías como la aterosclerosis, donde existe un infiltrado de macrófagos y linfocitos en la placa de ateroma además de una alta concentración de la quimioquina MCP-1<sup>103</sup>. Otros ejemplos son la enfermedad inflamatoria intestinal o la psoriasis, ambas caracterizadas por un infiltrado leucocitario junto con una alta expresión de quimioquinas, tales como RANTES, MIP-1 $\alpha$  e IP-10 en el caso de la primera y MCP-1 e IP-10 en el caso de la segunda<sup>104,105</sup>.

Debido a la caracterización de algunos patrones de expresión de quimioquinas en determinadas enfermedades, se ha abierto la puerta a futuras estrategias terapéuticas mediante el bloqueo o estimulación de estas moléculas. De hecho, ya existen estudios en ratones *knockout* que tratan de evaluar cómo la deficiencia de una determinada quimioquina puede influir en el desarrollo de una enfermedad<sup>106</sup>; en otros estudios se administra a ratones con determinada infección una quimioquina y se evalúa la gravedad del cuadro clínico<sup>107</sup>, o incluso, estudios que emplean vacunas para bloquear un receptor de quimioquinas e impedir que éstas ejerzan su función<sup>108</sup>.



### 3. Quimioquinas y Bronquiolitis

Como en cualquier otro tipo de infección o enfermedad inflamatoria, durante una bronquiolitis se produce una migración de células del sistema inmune al pulmón, donde tratan de controlar la infección por diferentes mecanismos.

Como ya se ha comentado anteriormente, uno de los procesos moleculares por los que los leucocitos migran al pulmón lo provoca la producción de quimioquinas a nivel local. De esta forma, los leucocitos circulantes en sangre periférica infiltrarían el pulmón gracias a la llamada de las quimioquinas secretadas a dicho nivel. Una vez que los leucocitos llegan al pulmón, ejercen su función tratando de controlar y eliminar la infección. Las manifestaciones clínicas de la bronquiolitis dependerán en gran medida de la respuesta inflamatoria y, por tanto, la expresión de quimioquinas tanto cualitativa como cuantitativa puede desempeñar un rol importante en esta patología.

Desde los años 90, momento en el que se empezaron a estudiar las quimioquinas con mayor interés, se sabe que el valor de ciertas quimioquinas está aumentado tanto en ratones como en humanos que sufren de una bronquiolitis como consecuencia de una infección viral. En concreto se ha visto que la expresión de estas quimioquinas está aumentada respecto a controles sanos en sangre periférica<sup>109</sup> (Figura 10), en lavado broncoalveolar<sup>110</sup> (Figura 11) y en secreciones nasofaríngeas<sup>111</sup>.

Prácticamente todas las quimioquinas o sus receptores han sido estudiadas en pacientes con bronquiolitis, pero las que más interés han generado son Rantes (CCL5)<sup>112</sup>, IL-8 (CXCL8)<sup>113</sup>, MIP-1 $\alpha$  (CCL3)<sup>114</sup>, MIP-1 $\beta$  (CCL4), GRO- $\alpha$  (CXCL1), GRO- $\beta$  (CXCL2), GRO- $\gamma$  (CXCL3)<sup>115</sup>, ENA-78 (CXCL5)<sup>115</sup>, I-TAC (CXCL11)<sup>116</sup>, Eotaxina (CCL11)<sup>117</sup>, MCP-1 (CCL2)<sup>118</sup>, TARC (CCL17)<sup>119</sup>, Fractalina (CX3CL1)<sup>120</sup>, IP-10 (CXCL10)<sup>119</sup> entre otras.

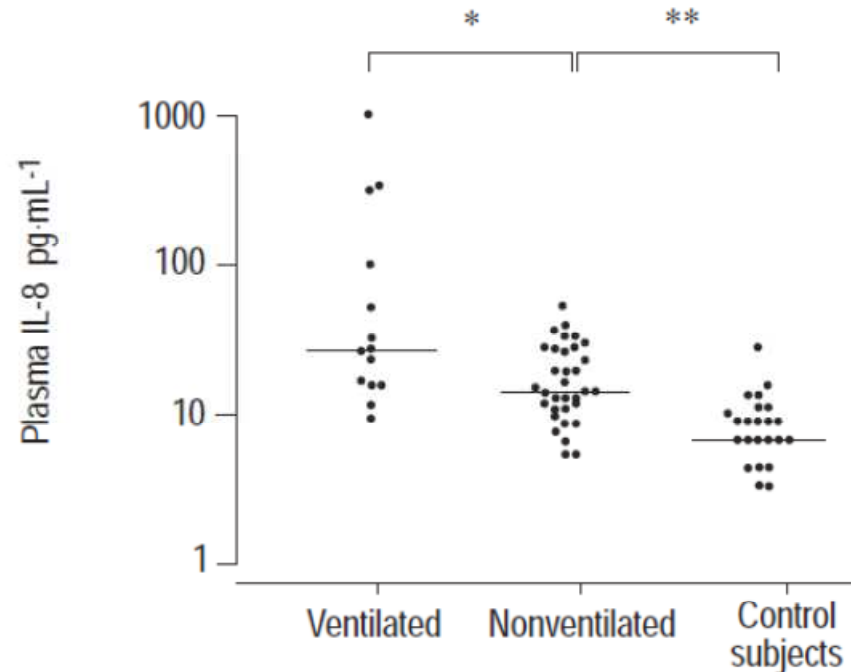


Figura 10. Estudio de quimioquinas en sangre periférica en pacientes ingresados por bronquiolitis en el que se demuestra la quimioquina IL-8 (CXCL8) está aumentada respecto a controles sanos y a su vez la concentración en es mayor en pacientes que precisaron ventilación mecánica (Adaptado de *Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, et al. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. Eur Respir J 1999;14:144-9*).

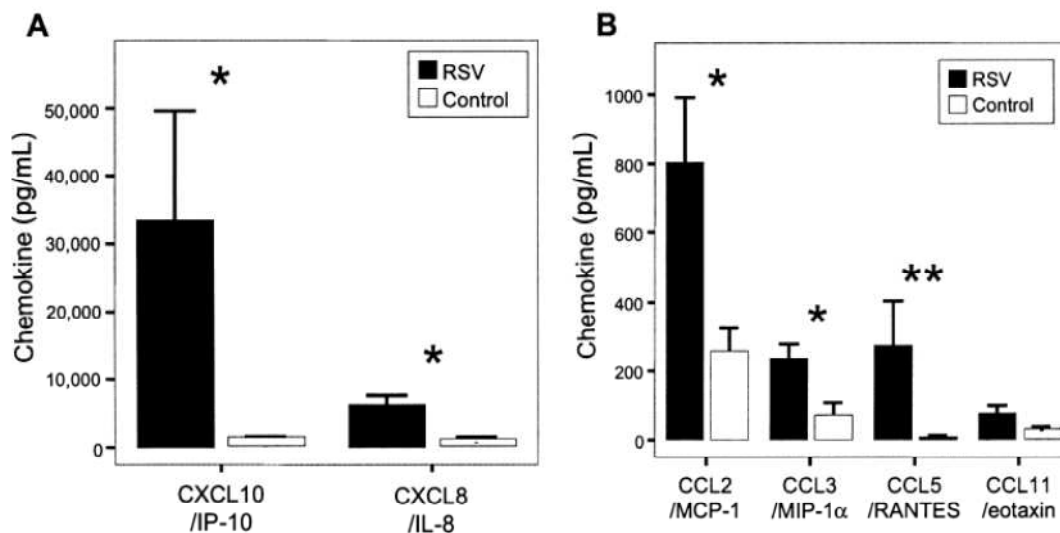
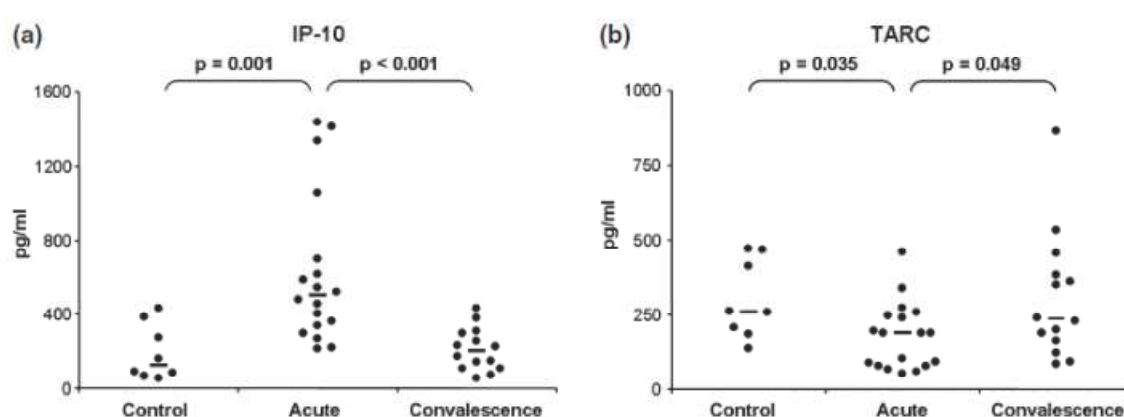


Figura 11. Estudio de quimioquinas en lavado broncoalveolar en el que se demuestra que ciertas quimioquinas están aumentadas en pacientes infectados con VRS (columna negra) respecto a controles sanos (columna blanca) (Adaptado de *McNamara PS, Flanagan BF, Hart CA, Smyth RL. Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. J Infect Dis 2005;191:1225-32*).

Todas estas quimioquinas han sido detectadas de manera significativa en muestras de pacientes con bronquiolitis respecto a controles sanos o frente a pacientes que sufren una infección por el mismo virus pero que no llegan a desarrollar una bronquiolitis<sup>75</sup>. Incluso algunos estudios han evaluado cómo en la fase de convalecencia la presencia de estas quimioquinas disminuye respecto al momento agudo<sup>119</sup> (Figura 12). Incluso algunos estudios han demostrado con microscopía óptica la presencia de dichas quimioquinas en tejido pulmonar de ratones infectados a través de anticuerpos que marcaban con un fluoróforo<sup>121</sup>.



**Figura 12. Estudio sobre las quimioquinas IP-10 y TARC en pacientes en fase aguda o convalecencia de una infección por el VRS respecto a controles sanos. Se observa que el momento agudo de la enfermedad ambas quimioquinas están aumentadas (Adaptado de Roe MF, Bloxham DM, Cowburn AS, O'Donnell DR. Changes in helper lymphocyte chemokine receptor expression and elevation of IP-10 during acute respiratory syncytial virus infection in infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:229-34).**

Sin embargo, aunque se sabe que las quimioquinas están implicadas en la migración de los leucocitos al pulmón durante una bronquiolitis, este conocimiento todavía es parcial, tanto de su implicación en la fisiopatología como en práctica clínica habitual. Tampoco se ha estudiado ampliamente si una producción excesiva o deficitaria de quimioquinas durante la bronquiolitis provoca una activación excesiva del sistema inmune, lo que provocaría mayor morbimortalidad.

Como ya se ha explicado ampliamente, el desencadenante inicial de una bronquiolitis es una infección viral, por lo que es esperable una activación LTc

controlados por LTh de tipo 1, ya que este tipo de respuesta inmune está diseñada para combatir infecciones intracelulares. En el caso de que la respuesta inmune se organizara con LTh de tipo 2 sería presumible que el curso de la bronquiolitis fuera más grave, ya que el sistema inmune del huésped desarrollaría una respuesta poco efectiva contra este tipo de infecciones o por lo menos no diseñadas específicamente para combatirlas.

Existen estudios que han demostrado la especificidad de ciertas quimioquinas para LTh1 y para LTh2. En concreto, se concede ya desde hace unos 20 años que el receptor de quimioquinas CXCR3 se expresa casi de manera exclusiva por los LTh1 mientras que CCR4 es altamente específico de los LTh2<sup>122-124</sup> (Figura 13 y 14).

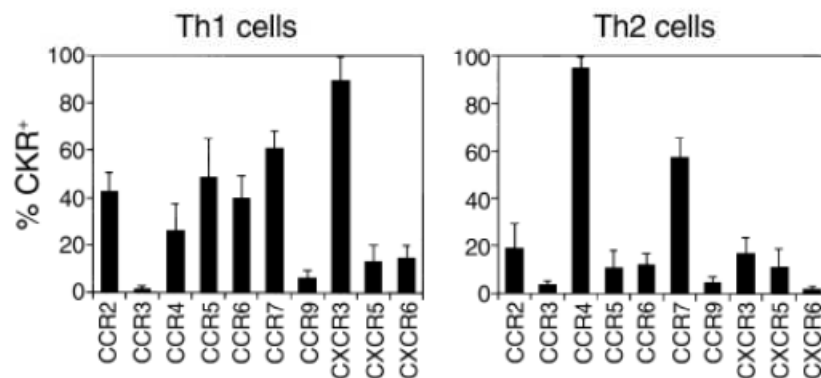


Figura 13. Estudio que evalúa la especificidad de diferentes receptores de quimioquinas (CKR) en LTh1 y LTh2. Se puede observar como CXCR3 se expresan de forma preferencial en LTh1 mientras que CCR4 lo hace en los LTh2 (Adaptado de Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, et al. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. J Clin Invest 2001;108:1331-9).

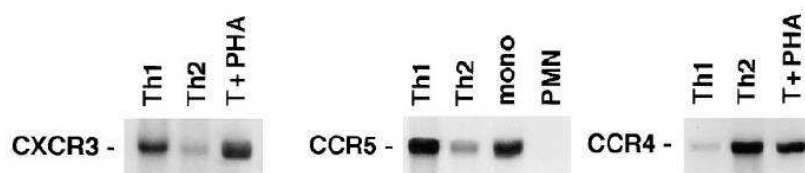


Figura 14. Análisis de mRNA mediante *Northern blot* en el que se observa como los LTh1 marcan para CXCR3 y CCR5 de manera preferente y como los LTh2 marcan para CCR4 (Adaptado de Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. J Exp Med 1998;187:129-34).

Además, tanto CXCR3 (específico de LTh1) y CCR4 (específico de LTh2) pueden ser activados por quimioquinas específicas (es decir, que solo activan a uno de dichos receptores). A diferencia de estas quimioquinas específicas para la activación de los LTh, existen otras quimioquinas que pueden activar tanto receptores presentes en los LTh1 como en los LTh2<sup>87</sup>. La Tabla I representa las diferencias entre los LTh1 y LTh2 y sus citoquinas específicas, así como algunas quimioquinas y sus receptores. Por tanto, esto confiere a las quimioquinas específicas un papel muy interesante, ya que su estudio podría revelar qué tipo de respuesta LTh se está desencadenando en un paciente con bronquiolitis.

Linfocitos T <i>helper</i>			
LTh1		LTh2	
Citoquina específica	IFN $\gamma$	Citoquina específica	IL-4
Receptores de quimioquinas	Quimioquina	Receptores de quimioquinas	Quimioquina
CXCR3	MIG IP-10	CCR3	Rantes MCP-2
CCR5	Rantes MCP-2	CCR4	TARC MDC

**Tabla I. Diferencias entre LTh1 y LTh2 respecto a las citoquinas que producen, receptores de membrana específicos y quimioquinas que los estimulan. Como se puede apreciar Rantes y MCP-2 estimulan tanto a CCR5 como a CCR3 por lo que no se las puede considerar específicas de un tipo de respuesta, mientras que MIG e IP-10 solo estimulan a CXCR3, lo que las hace específicas de LTh1, y TARC y MDC solo estimulan a CCR4, específicas de LTh2.**

Pese a que existen estudios desde hace más de 25 años sobre quimioquinas y su implicación en las bronquiolitis, el rol que éstas desempeñan no ha sido estudiado a fondo y menos aún llevado a la práctica clínica habitual. No en vano la búsqueda por palabras clave *Respiratory Syncytial Viruses* y *Chemokines* en el motor de búsqueda PubMed devuelve un total de 155 entradas (la primera de ellas de 1991). Debido a su relativo desconocimiento, las quimioquinas en la bronquiolitis son un campo todavía por explorar, no solo como moléculas implicadas en esta patología sino también como posibles dianas terapéuticas.

# HIPÓTESIS

---

Durante una bronquiolitis, la respuesta inmune, tanto el tipo como la potencia de la misma, puede influir en la gravedad del cuadro clínico. Teniendo esto en cuenta, el estudio inmunológico que se realice en el momento del ingreso podría permitir diferenciar entre aquellos pacientes con evolución desfavorable y aquellos que, por el contrario, presentan un cuadro clínico más benigno.

# OBJETIVOS

---

## 1. Objetivo principal

Describir la respuesta inmunológica linfocitaria tipo T en niños ingresados por bronquiolitis aguda en UCIP a través de la medición de patrones de expresión de receptores de quimioquinas y sus ligandos, y la producción de citoquinas.

## 2. Objetivos Secundarios

1. Analizar las características epidemiológicas y clínicas de los pacientes con Bronquiolitis aguda que requieren ingreso en UCIP.
2. Conocer la evolución de los pacientes con bronquiolitis aguda que ingresan en UCIP en nuestro medio.
3. Analizar la relación entre el tipo de respuesta inmunitaria a cargo de los LT y los parámetros epidemiológicos, clínicos, analíticos y evolutivos en pacientes con bronquiolitis aguda ingresados en UCIP.
4. Analizar el patrón de expresión de receptores de quimioquinas específicos de LTh y sus ligandos y su asociación a alguna característica epidemiológica, clínica, analítica y evolutiva en pacientes con bronquiolitis aguda ingresados en UCIP.

# MATERIAL Y MÉTODOS

---

El presente estudio ha sido realizado en la UCIP del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús de Madrid, donde se realizó el reclutamiento de pacientes, y en el Laboratorio de Investigación Oncológica de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Universitario Niño Jesús de Madrid, donde se realizaron los procedimientos experimentales.

Este estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús con fecha de 3 de diciembre de 2012, con el código interno R-0058/12 (Anexo I).

La utilización de los datos obtenidos se realizó cumpliendo lo establecido en las Leyes vigentes en España de protección de datos (LOPD) Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal. El estudio cumple las normas de la Declaración de Helsinki.

Se realizó un estudio prospectivo y observacional en los pacientes ingresados en la UCIP del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús por bronquiolitis. Se evaluaron los subtipos linfocitarios a través de las citoquinas específicas de respuestas LTh1 o LTh2 en muestras de sangre periférica de los pacientes al ingreso en UCIP. Además, se estudió el patrón de expresión de receptores de quimioquinas y sus ligandos específicos de dichos tipos de respuesta. La implicación del tipo de respuesta linfocitaria respecto a variables clínicas y analíticas en la práctica médica habituales también fue estudiada.

## 1. Definiciones

- *Bronquiolitis*: primer episodio de sibilancias en un niño menor de dos años en el contexto de un cuadro viral.
- *Bronquiolitis Grave*: bronquiolitis que requiere ingreso en UCIP.



- *Sobreinfección bacteriana:*

- Segura: aquella en la que se aísla un patógeno bacteriano en un cultivo habitualmente estéril y que éste sea responsable de empeoramiento clínico del paciente.
- Probable: datos analíticos compatibles con sobreinfección bacteriana (aumento en sangre o plasma de proteína C reactiva > 7 mg/dL; procalcitonina > 0,5 ng/dL; leucocitosis > 15.000/ $\mu$ L, neutrofilia > 10.000/ $\mu$ L) en ausencia de crecimiento bacteriano en cultivos realizados.

## 2. Población a estudio y tamaño muestral

Se incluyeron todos los pacientes ingresados por bronquiolitis en la UCIP del Hospital Infantil Universitario del Niño Jesús que cumplían todos los criterios de inclusión y no presentaban ningún criterio de exclusión durante el periodo a estudio.

No se determinó el tamaño muestral antes de iniciar el estudio al tratarse de un estudio de casos observacional en el que se pretende describir unas determinadas características en los pacientes con bronquiolitis (estudio no realizado anteriormente). El número de sujetos a estudio vino dado por la incidencia de bronquiolitis en el periodo de estudio.

## 3. Periodo de estudio

El reclutamiento de pacientes se realizó desde el 1 de noviembre de 2012 hasta el 28 de febrero de 2013.

## 4. Criterios de selección de pacientes

### 4.1. Criterios de inclusión

- Pacientes ingresados por bronquiolitis en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús.

- Existencia de consentimiento informado firmado por los padres o tutores del paciente (Anexo II y III).

## 4.2. Criterios de exclusión

- Pacientes en los que, pese a cumplir los criterios de inclusión, no se obtuvo sangre periférica suficiente para realizar los estudios planteados en el estudio.

## 5. Desarrollo del estudio

### 5.1. Captación de pacientes

Todos los días de la semana durante el periodo de estudio se revisaron los ingresos en UCIP del día anterior por bronquiolitis con el fin de determinar qué pacientes eran candidatos a formar parte del estudio. Una vez detectados estos pacientes, se les informaba del estudio que se estaba llevando a cabo en la unidad y se les ofrecía la oportunidad de formar parte de él. Una vez que los padres o tutores del paciente firmaban el consentimiento informado (Anexo II y III), se procedía a la extracción de sangre periférica del paciente.

Se anotó qué pacientes rechazaron formar parte del estudio y aquellos en los que no se obtuvo sangre periférica suficiente para realizar los estudios planteados.

### 5.2. Variables clínicas

Una vez incluidos en el estudio, el día del alta de UCIP, se recogían los siguientes datos clínicos de cada uno de los pacientes desprendidos de la práctica habitual y de los protocolos de tratamiento de bronquiolitis vigentes en la unidad en la que se desarrolló el estudio (Anexo IV):

#### 5.2.1 Datos epidemiológicos

Fecha de nacimiento, sexo, fecha de ingreso hospitalario, fecha de ingreso en UCIP, fecha de alta de UCIP, fecha de alta hospitalaria, antecedentes personales de interés, procedencia del ingreso.

### **5.2.2 Síntomas principales al ingreso en UCIP**

Días de evolución de los síntomas, presencia de fiebre y/o apneas, gravedad de la bronquiolitis según la escala de WD modifica por Farrés en el momento del ingreso<sup>125,126</sup> (Anexo V).

### **5.2.3 Datos analíticos habituales al ingreso**

Leucocitos en sangre periférica, neutrófilos totales en sangre periférica, PCR y PCT en analítica realizada el ingreso.

### **5.2.4 Resultados microbiológicos**

Crecimiento en cultivos realizados y presencia de VRS en secreciones nasofaríngeas.

### **5.2.5 Resultados radiológicos**

Número de radiografías realizadas en cada paciente, alteraciones radiológicas detectadas.

### **5.2.6 Tratamiento recibido**

Corticoterapia, antibioterapia, necesidad de soporte respiratorio y tipo, duración del soporte respiratorio.

### **5.2.7 Datos evolutivos**

Éxito durante el ingreso o necesidad de reingreso en UCIP.

Los médicos que atendieron a los pacientes fueron siempre especialistas en Pediatría y sus Áreas Específicas con formación específica en Cuidados Intensivos Pediátricos. El tratamiento recibido por los pacientes fue el indicado por dichos médicos y en ningún caso la participación en este estudio influyó en el tratamiento recibido ni en las pruebas que se les realizaron de forma rutinaria.

## **5.3. Obtención y procesamiento inicial de la muestra de sangre periférica**

Se obtuvo una muestra de sangre periférica de al menos 2 mL de los pacientes incluidos en el estudio y siempre en las primeras 24 horas tras el ingreso en UCIP. Dicha extracción se realizó por parte del enfermero de la unidad

encargado ese día del cuidado del paciente y a petición de alguno de los investigadores del estudio.

La muestra de sangre periférica se introducía en un bote *BD Vacutainer®* de vacío con EDTA (Becton, Dickinson and Company) y se trasladaba sin demora al Laboratorio de Investigación Oncológica de la Fundación para la Investigación Biomédica del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús para su procesamiento.

#### 5.4 Procesamiento y almacenaje de muestras

El procesamiento de la muestra se realizaba en menos de 6 horas desde su recepción en el laboratorio. El procesamiento de estas muestras incluía los siguientes pasos:

- Dilución al medio de la muestra obtenida con *Gibco® PBS pH 7.2* (Life Technologies Corporation; California, Estados Unidos).
- Separación de células mononucleares mediante gradiente de densidad *Ficoll-Paque™ PLUS* (GE Healthcare; Piscataway, Estados Unidos) según las indicaciones del fabricante.
- Una vez realizada la técnica anterior se procedía a la recolección por separado de plasma y células mononucleares:
  - Recolección de plasma en criotubos *Nalgene™ General Long-Term Storage Cryogenic Tubes* (Thermo Fisher Scientific Inc. California, Estados Unidos). Dichos criotubos fueron almacenados en un congelador a -80°C una vez etiquetados.
  - Recolección de células mononucleares en criotubos *Nalgene™ General Long-Term Storage Cryogenic Tubes* (Thermo Fisher Scientific Inc. California, Estados Unidos). Para el almacenaje de las células mononucleares en viabilidad se procedió a su dilución en dimetil sulfóxido (*Dimethyl sulfoxide Cell culture grade BC*, AppliChem; Darmstadt, Alemania) al 10% en suero fetal bobino y posteriormente se almacenaron en un congelador a -80°C una vez etiquetados.

## 5.5 Procesamiento final de las muestras

Una vez finalizado el periodo de reclutamiento de pacientes se procedió al análisis de las muestras congeladas mediante los siguientes procedimientos:

### 5.5.1 Detección de quimioquinas en sangre periférica

Para ello se empleó el plasma congelado de cada paciente. Se realizó la medición con técnica de ELISA con los kits comerciales *RayBio® Human ELISA Kit* (RayBiotech, Inc. Norcross, Estados Unidos) para IP-10, MIG, TARC y MDC según el protocolo del fabricante.

La medición de la absorbancia se realizó en un lector de placas de *ELISA Infinite® 200 Pro* (Tecan, Systems, Inc. San José, Estados Unidos).

Todas las determinaciones fueron analizadas por duplicado; se calculó la media de ambos valores para el análisis final. La determinación media de absorbancia fue trasformada a unidades de concentración (pg/mL), utilizando la curva de calibración obtenida al analizar las placas de ELISA, empleando para ello la hoja de cálculo *Microsoft Excell 2007* (Microsoft Office; Redmond, Estados Unidos). Debido a que las muestras estaban diluidas al medio previo a su análisis, este factor se corrigió a la hora de expresar de forma última el valor de concentración.

### 5.5.2 Análisis de expresión génica

Para ello se utilizó la muestra de células mononucleares congeladas procedentes de la muestra de sangre periférica.

Se aisló el RNA procedente de dichas muestras mediante *TRIzol® LS Reagent* (Ambion®, Life Technologies Corporation; California, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante y se cuantificó mediante *NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc. California, Estados Unidos). Como criterio de calidad se registró la absorbancia 260/280.

Una vez aislado el RNA de cada paciente se procedió a la síntesis de cDNA utilizando *SuperScript® VILO™ Master Mix* (Invitrogen™, Life Technologies Corporation; California, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante. Dicha reacción se realizó en un termociclador *Mastercycler® ep* (Eppendorf®, Hamburg, Alemania).

Tras la síntesis de cDNA, se realizó la RTqPCR mediante la mastermix *TaqMan® Gene Expression* (Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation; California, Estados Unidos) y los kits *TaqMan® Gene Expression* para los genes CD4, CD8, FOXP3, INF $\gamma$ , IL-4, CXCR3, CCR4 y GAPDH (Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation; California, Estados Unidos) en termociclador *Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, California, Estados Unidos) según el protocolo del fabricante.

Estos genes fueron los elegidos por representar de manera específica a diferentes poblaciones celulares concretas: 1) CD4, LT *helper*; 2) CD8, LT citotóxicos; 3) FOXP3, LT reguladores; 4) INF $\gamma$ , LTh1; 5) IL-4, LTh2; 6) CXCR3, LTh1; 7) CCR4, LTh2; 8) GAPDH, fue el gen empleado como control interno de la técnica<sup>127</sup>.

El análisis de los resultados de expresión génica se realizó con el programa informático *DataAssit™ Software v3.01* (Applied Biosystems®, Life Technologies Corporation; California, Estados Unidos). Los resultados obtenidos se expresaron en forma de  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (este parámetro no tiene unidades propias y se expresa como unidades arbitrarias de medida)<sup>128</sup>.

## 6. Análisis estadístico

Tanto los resultados obtenidos de las historias de los pacientes como los datos experimentales fueron introducidos en una base de datos para su estudio.

Los resultados obtenidos de este análisis se expresan en la sección resultados en forma de mediana (mínimo-máximo, desviación estándar) a no ser que se especifique lo contrario. Dado que los datos obtenidos no seguían en la mayoría de los casos una distribución normal, se utilizaron preferentemente test no paramétricos para el análisis.

Para valores independientes se empleó el test de la U de Mann-Whitney (significación unilateral) para comparar dos categorías, mientras que la prueba de Kruskal-Wallis se empleó en el caso de más de 3 categorías. Para las variables dependientes se determinó la normalidad de los datos mediante la

prueba de Saphiro-Wilk. En el caso de que siguieran una distribución normal se empleó la t-Student para datos independientes y el test de Wilcoxon en el caso contrario.

Para el análisis de correlaciones entre variables cuantitativas se realizó el coeficiente de correlación de Pearson.

Se consideró una diferencia significativa aquella en la que el valor de p fuera igual o menor de 0,05.

Tanto la base de datos como el análisis estadístico se realizó mediante el paquete electrónico *IMB® SPSS® Statistics* (versión 19, IBM Company®; Nueva York, Estados Unidos).

Para la representación gráfica de los resultados se decidió utilizar diagramas de cajas. En este tipo de gráficos se representan los valores habituales mediante la siguiente interpretación:

- Los extremos de la caja representan el cuartil 1 y cuartil 3.
- La raya negra central de la caja representa el cuartil 2 o mediana.
- Los bigotes a los lados de la caja representan:
  - En el caso de que no haya valores atípicos, el mínimo y el máximo (hasta un valor 1.5 veces el rango intercuartil).
  - En caso de que existan valores atípicos, el extremo inferior del bigote corresponde al cuartil 1 menos 1,5 veces el rango intercuartil y el superior corresponde al cuartil 3 más 1,5 veces el rango intercuartil.
- Los círculos más allá de los bigotes representan los valores atípicos (aquellos con un valor por encima o por debajo del al cuartil 1 menos 1,5 veces el rango intercuartil o cuartil 3 más 1,5 veces el rango intercuartil, respectivamente).
- Los asteriscos más allá de los bigotes representan los valores extremadamente atípicos (aquellos con un valor por encima o por debajo del al cuartil 1 menos 3 veces el rango intercuartil o cuartil 3 más 3 veces el rango intercuartil, respectivamente).

# RESULTADOS

## 1. Análisis descriptivo

### 1.1 Epidemiología, clínica, analítica y terapéutica.

#### 1.1.1 Datos epidemiológicos

Se propuso participar en el estudio a 50 pacientes, de los que solo uno decidió no formar parte, por lo que el tamaño muestral final fue de 49 niños. Tenían una mediana de edad de 35 días (9-723; 167). La mayoría de ellos eran varones (31, 63,3%). Además, los pacientes varones eran de menor edad respecto a las mujeres (62 vs 195 días,  $p=0,03$ ).

Lo más frecuente es que los pacientes no tuvieran antecedentes personales de interés (35, 71,4%; Gráfico 1).

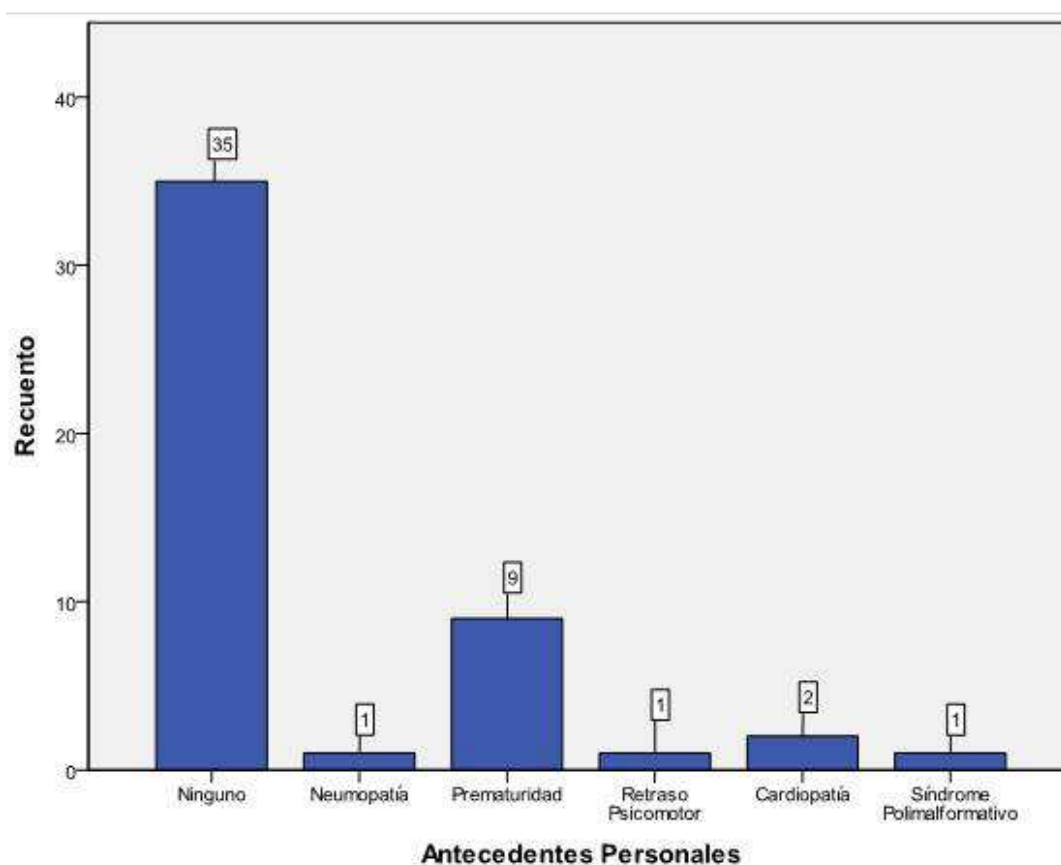


Gráfico 1. Antecedentes personales de los pacientes incluidos en el estudio



Quince pacientes (30,6%) precisaron ingreso directo desde el Servicio de Urgencias a la UCIP, mientras que el resto procedían de planta de hospitalización.

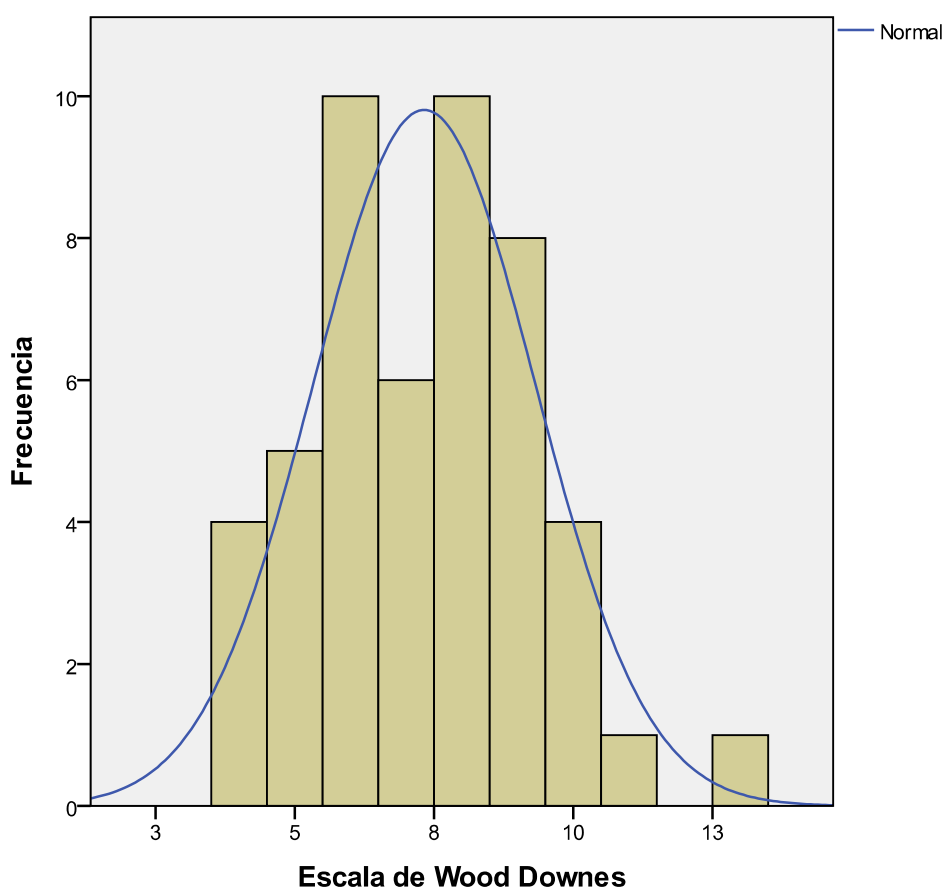
De entre todos los pacientes, 3 de ellos (6,1%) habían sido ingresados antes en UCIP por otros motivos.

Ninguno de los pacientes estudiados falleció durante el ingreso ni precisó reingresar en UCIP tras ser dado de alta a planta.

### 1.1.2 Clínica

La mediana de días de evolución de la enfermedad fue 3 días (0-7; 1,7). Veinte pacientes (40,8%) había presentado fiebre y 9 (18,4%) apneas.

Según la escala de WD, la mediana de la gravedad fue de 7 puntos (4-13; 2; Gráfico 2), siendo moderada en 25 pacientes (51%) y grave en 24 (49%).



**Gráfico 2. Recuento de pacientes según gravedad de escala de Wood-Downes**

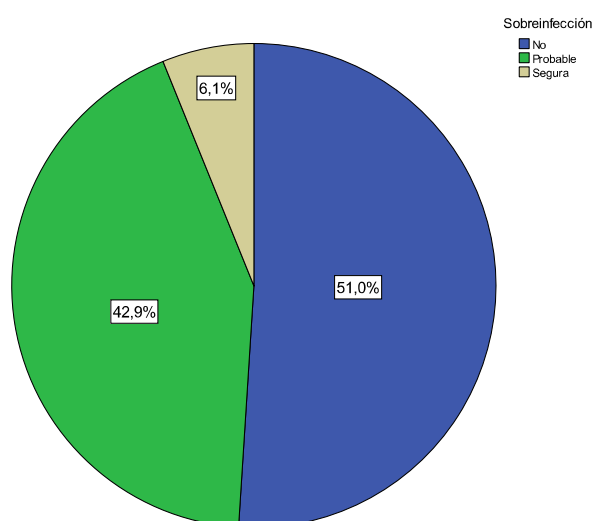
### 1.1.3 Datos de laboratorio habituales

Se detectó VRS en secreciones nasales en el 96% de los pacientes (47). En todos se extrajo hemocultivo, y el resultado fue positivo solo en 1 de ellos (2%), aislándose *Staphilococo aureus*. Dos pacientes presentaron crecimiento en urocultivo a *Escherichia coli* (aunque este tipo de cultivo no fue recogido en todos los pacientes).

A todos los pacientes se les extrajo una muestra de sangre al ingreso para realizar la medición de datos de laboratorio habituales. Se obtuvieron los siguientes resultados:

- Leucocitos totales: 9.730/ $\mu$ L (1.380-25.400; 5.214).
- Neutrófilos totales: 3.889/ $\mu$ L (1.110-15.200; 3.871).
- Linfocitos totales: 3.915/ $\mu$ L (1.030-7.700; 1759).
- Monocitos totales: 645/ $\mu$ L (180-2.180; 538).
- PCR 1,15 mg/dL (0,10-23,14; 4,63).
- PCT 0,24 ng/mL (0,07-45,8; 8,49).

El 51% (25) de los pacientes no presentó sobreinfección bacteriana al no presentar datos compatibles con ésta y no detectarse crecimiento en los cultivos extraídos. Se catalogó como probable (datos analíticos alterados con cultivos negativos) a 21 (42,9%) y como segura (cultivo positivo) a 3 (6,1%) (Gráfico 3).



**Gráfico 3. Porcentaje de pacientes con sobreinfección bacteriana según tipo**

### 1.1.4 Datos radiológicos

Al 96% de los pacientes (47) se les realizó al menos una radiografía de tórax (mediana 2 radiografías por paciente durante su ingreso en UCIP), de las que resultaron patológicas el 78,7% (37 pacientes).

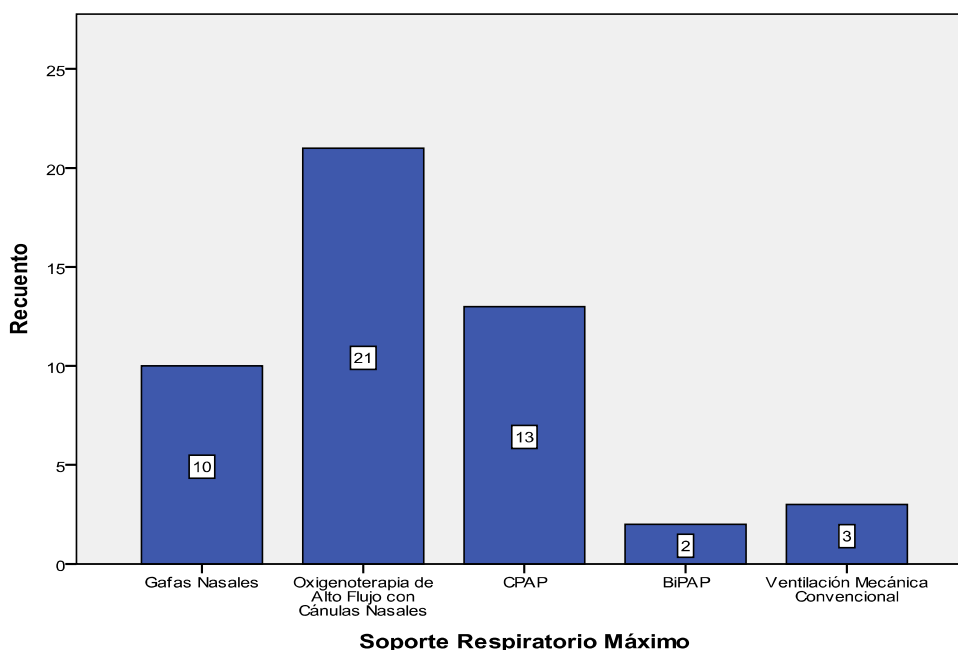
Las alteraciones radiológicas más frecuentes fueron las atelectasias (18 pacientes, 38%), condensación (8, 16%), hiperinsuflación (7, 14%) e infiltrados (4, 8%).

### 1.1.5 Tratamiento

#### 1.1.5.1 Tratamiento respiratorio

El tipo de soporte instaurado al ingreso fue: 1) GN 15 (30,6%), 2) OAF 25 (51%), CPAP 8 (16,3%) y VMC en 1 (2%). Durante su estancia en UCIP, 12 pacientes (24,5%) requirieron aumentar el tipo de soporte respiratorio respecto al ingreso.

El soporte respiratorio máximo empleado por paciente fue: 1) GN 10 (20%), 2) OAF 21 (42,9%), CPAP 13 (26,5%), BiPAP 2 (4,1%) y VMC en 3 (6,1%) (Gráfico 4). Al agrupar juntos OAF, CPAP y BiPAP como ventilación no invasiva, ésta se empleó en 36 pacientes (73,5% de la muestra).



**Gráfico 4. Tipo de soporte respiratorio máximo durante el ingreso en UCIP**

### 1.1.5.2 Tratamiento médico

Recibieron antibiótico 32 pacientes (65,3%); entre ellos, la cefotaxima fue el más frecuente (50%). Se emplearon corticoides en 8 pacientes (16,3%), siendo más frecuente su empleo en pacientes de más edad (320 vs. 69 días,  $p=0,013$ ).

### 1.1.6 Evolución

La mediana de días de ingreso fue de 5 días (1-14; 3,1). La mediana de horas de soporte respiratorio diferente a GN fue de 88 horas (27-322; 70,7).

## 1.2. Inmunofenotipo

### 1.2.1 Subtipos de LT

Se obtuvo muestra suficiente para el análisis de expresión génica en 47 pacientes. Las medianas de expresión génica para los diferentes receptores específicos para LTh (CD4) y LTc (CD8) fueron:

- CD4: 12,6 (2,1-42,4; 9,7).
- CD8: 36,2 (4,8-127,1; 32,9).

Al realizar el cociente individual entre ambos receptores para conocer qué tipo de LT predominaba en cada paciente se observó que en el 87,2% de los pacientes existía una expresión génica preferencial de CD8 (LTc). La mediana del índice CD8/CD4 fue 2,7 (0,56-16,67; 3,2).

### 1.2.2 Subtipos de LT helper

Se midió la expresión génica de IFN $\gamma$  (LTh1) e IL-4 (LTh2) en los mismos 47 pacientes. También se pudo medir la expresión génica de FOXP3 (LTreg) en todos ellos:

- IFN $\gamma$ : 28,3 (3,2-281,2; 52).
- IL-4: 1,3 (0,1-281,2; 40,7).
- FOXP3: 1,2 (0,3-11,4; 1,8).

Al realizar el cociente entre IFN $\gamma$  e IL-4 se observó una expresión predominante de IFN $\gamma$  (LTh1) en el 97,8% de los pacientes analizados. La mediana de este índice (IFN $\gamma$ /IL-4) fue de 15,4 (0,8-403,9; 15,4).

### 1.3. Quimioquinas y sus receptores

#### 1.3.1 Quimioquinas específicas de LTh

La medición de los niveles mediana de las quimioquinas específicas para LTh1 (IP-10 y MIG) y LTh2 (TARC y MDC) obtuvo los siguientes resultados:

- IP-10 (N=48): 291,8 pg/mL (47,9-3061,9; 519,2).
- MIG (N=48): 6169,3 pg/mL (1501,5-30810; 5318,7).
- TARC (N=48): 325,6 pg/mL (29,4-633,2; 168,3).
- MDC (N=47): 432,5 pg/mL (65-781,1; 188,2).

Se pudo realizar medición en todos los pacientes para las diferentes quimioquinas, pero en algunos casos estas mediciones estuvieron por encima o por debajo del rango de medida por lo que se excluyeron del análisis.

#### 1.3.2 Expresión génica de receptores de quimioquinas específicas de LTh

Se midió la expresión génica de los receptores de quimioquinas específicos de LTh en 47 pacientes, CXCR3 (específico de IP-10 y MIG) y CCR4 (específico de TARC y MDC) con los siguientes resultados:

- CXCR3: 11 (2,9-27,3; 6,2)
- CCR4: 28 (13,6-46,4; 7,3)

Al realizar el cociente de expresión génica entre CXCR3/CCR4 se observó que el 95,7% de los pacientes expresaba en mayor medida CCR4. El valor mediano de este índice fue 0,41 (0,14-1,07; 0,22).

## 2. Análisis estadístico

### 2.1. Variables clínicas y evolutivas

#### 2.1.1 Duración del ingreso

La muestra se dividió en dos grupos: por un lado, aquellos pacientes que estuvieron ingresados más días que la mediana, catalogados como “ingresos largos” (N=20), y, por otro, aquellos que estuvieron ingresados los mismos días, o menos, que la mediana, catalogados entonces como “ingresos cortos” (N=29).

Se encontró que los pacientes con ingresos largos eran de menor edad (34 vs 163 días,  $p=0,002$ ) y además precisaban más horas de soporte respiratorio (164 vs 69 horas,  $p<0,0001$ ) respecto a los ingresos cortos.

Los pacientes con ingresos largos presentaban valores de leucocitos y neutrófilos totales más bajos (7.742/ $\mu$ L vs 12.941/ $\mu$ L y 3.401/ $\mu$ L vs 6.986/ $\mu$ L;  $p<0,0001$  en ambos casos). Sin embargo, no se encontraron diferencias al analizar los valores de quimioquinas ni datos de expresión génica.

#### 2.1.2 Sexo del paciente

Como ya se ha comentado anteriormente, los varones tenían menos edad que las mujeres de la muestra.

Además, los varones expresaron en menor medida CXCR3 respecto a las mujeres (9,2 vs 16,9,  $p<0,0001$ ). El ratio de expresión génica entre CXCR3/CCR4 también fue diferente, con una polarización hacia CCR4 mayor en mujeres (0,35 vs 0,59,  $p<0,0001$ ). Se encontró también que los varones tenían mayor número de monocitos al ingreso (1.012/ $\mu$ L vs 560/ $\mu$ L,  $p=0,007$ ).

No se encontraron diferencias entre resto de variables analizadas.

#### 2.1.3 Pacientes con antecedentes personales

Al analizar el grupo de pacientes con antecedentes personales de interés que pudieran motivar una bronquiolitis grave, se encontró que los que presentaban factores de riesgo eran de mayor edad (209,4 vs 71,1 días,  $p=0,05$ ).

No se hallaron diferencias entre los pacientes sanos y los que presentaban antecedentes personales en las demás variables analizadas tanto clínicas como analíticas.

Entre los valores de quimioquinas se observó que MDC presentaba unos valores menores en los pacientes con antecedentes de interés respecto a los que no tenían antecedentes (343,3 vs 472,3 pg/mL,  $p=0,034$ ). Sin embargo, en el resto de valores de quimioquinas y de expresión génica no se encontraron diferencias.

#### **2.1.4 Edad de los pacientes**

##### **2.1.4.1 Menores de 6 semanas**

Se dividió la muestra en menores de 6 semanas (N=27; 55,1%) y mayores de 6 semanas (N=22; 44,9%).

Se encontró que los menores de 6 semanas consultaban antes en el hospital (2,67 vs 3,68 días;  $p=0,041$ ) aunque presentaban bronquiolitis menos graves según la escala de WD (6,7 vs 8,1;  $p=0,014$ ).

Estos pacientes presentaban valores menores de leucocitos (9.252/ $\mu$ L vs 12.999/ $\mu$ L;  $p=0,013$ ) y neutrófilos (3.822/ $\mu$ L vs 7.679/ $\mu$ L;  $p=0,001$ ) en sangre periférica, pero, en cambio, los valores de monocitos eran mayores (1.025/ $\mu$ L vs 640/ $\mu$ L;  $p=0,043$ ). No se observaron diferencias en el número de linfocitos totales.

Al analizar los datos evolutivos se observó que los menores de 6 semanas no requerían ni más días de ingreso en UCIP ni más días de soporte respiratorio.

Respecto a los datos de expresión génica y quimioquinas, solo el valor de MIG mostraba diferencias entre los menores y mayores de 6 semanas (5.363 pg/mL vs 9.407 pg/mL;  $p=0,013$ ).

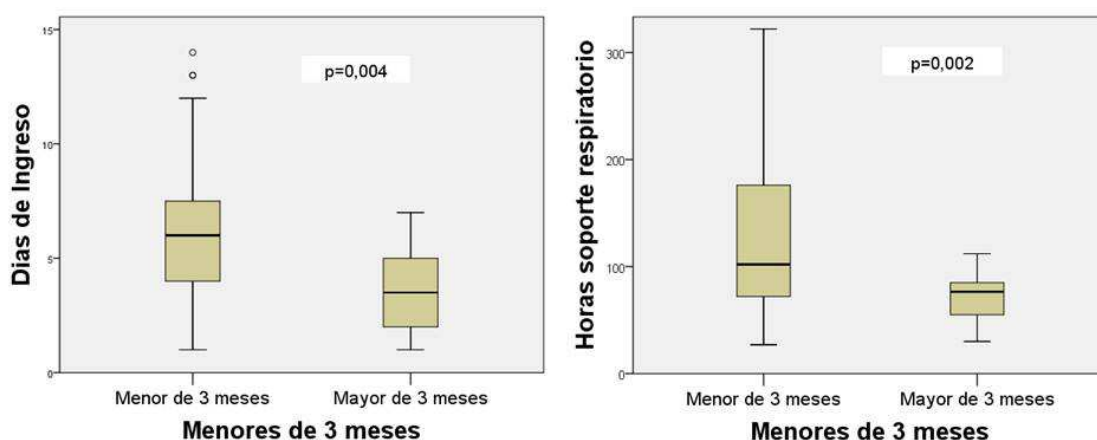
##### **2.1.4.2 Menores de 3 meses**

Los menores de 3 meses representaron el 72,4% de la muestra (N=35) y los mayores de 3 meses el 28,6% (N=14).

En este caso se encontró que los pacientes menores de 3 meses requerían más días de ingreso (6,3 vs 3,6 días,  $p=0,004$ ) y más horas de soporte respiratorio (126 vs 72 horas,  $p=0,002$ ) (Gráfico 5). Estos pacientes acudían al hospital de forma más temprana (2,8 vs 3,9 días,  $p=0,04$ ), aunque en el momento del ingreso no presentaban una puntuación más alta en la escala de WD (7,1 vs 7,9,  $p=0,2$ ).

En cuanto a los datos analíticos habituales, se encontró que los pacientes menores de 3 meses presentaban menor número de leucocitos ( $9.290/\mu\text{L}$  vs  $14.642/\mu\text{L}$ ) y de neutrófilos totales ( $4.185/\mu\text{L}$  vs  $8.868/\mu\text{L}$ ), aunque no se encontraron diferencias significativas en los valores de linfocitos, monocitos, PCR y PCT.

Tampoco se encontraron diferencias en estos grupos de edad al analizar los valores de expresión génica ni los valores de quimioquinas. Del mismo modo, tampoco se encontraron diferencias entre estos dos grupos de edad en relación a los ratios calculados de expresión génica.



**Gráfico 5. Diferencias entre los pacientes mayores y menores de 3 meses en función de las días de ingreso y las horas de soporte respiratorio.**

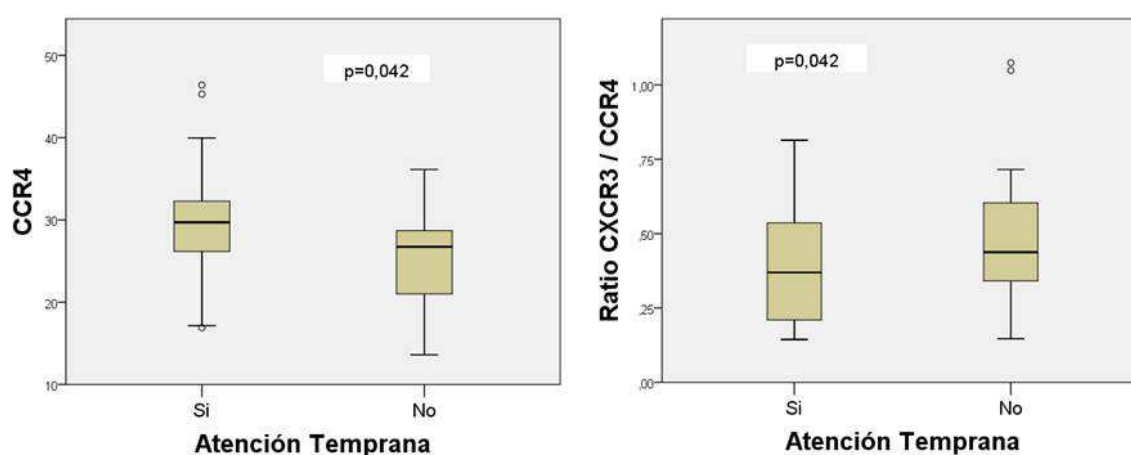
### 2.1.5 Atención temprana

La muestra se dividió en dos grupos: por un lado, aquellos pacientes que fueron atendidos por debajo de la mediana de días de evolución clínica ( $N=31$ , 63,3%) y, por otro, los que realizaron la consulta más tarde ( $N=18$ , 36,7%).



Este hecho no influyó en los datos clínicos ni analíticos habituales, ya que no alcanzaron la significación estadística.

En cuanto a los valores de quimioquinas, ninguno mostró diferencias. Sin embargo, los pacientes que fueron atendidos de manera temprana mostraban mayor expresión de CCR4 (29,6 vs 25,1;  $p=0,042$ ), lo que influyó en que en dichos pacientes el ratio CXCR3/CCR4 estuviera polarizado hacia CCR4 (0,38 vs 0,52;  $p=0,042$ ) (Gráfico 6). La expresión génica de CXCR3 no mostró diferencias entre estos dos grupos de pacientes.



**Gráfico 6. Diferencias de expresión en CCR4 en los pacientes que según la premura en la atención en el hospital. Esta diferencia en CCR4 condiciona que el ratio CXCR3/CCR4 muestre diferencias entre ambos grupos.**

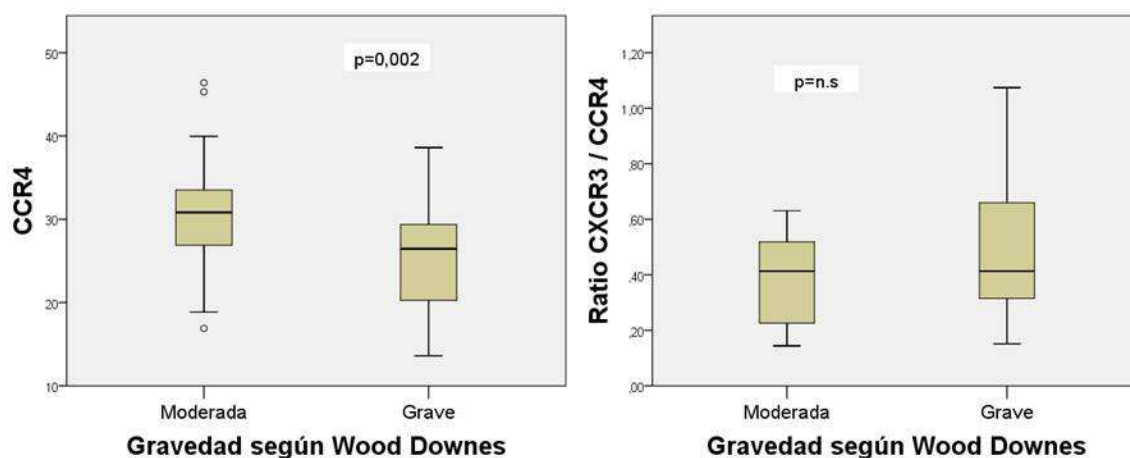
### 2.1.6 Gravedad según escala de Wood-Downes

Según esta escala de gravedad clínica, de los 49 pacientes de la muestra, 25 (51%) presentaban una bronquiolitis moderada y el resto (24; 49%) una bronquiolitis grave.

Al analizar las variables habituales clínicas y analíticas no se encontraron diferencias entre los pacientes con bronquiolitis moderada o grave.

Al buscar diferencias entre estos pacientes en referencia a los valores de quimioquinas y de expresión génica analizados, solo se encontró que los pacientes con bronquiolitis moderada presentaban valores más altos de CCR4 respecto a las bronquiolitis graves según WD (30,9 vs 24,6,  $p=0,002$ ). Sin

embargo, estas diferencias no se encontraron en sus ligandos (MDC y TARC) ni en el ratio CXCR3/CCR4 (Gráfico 7).



**Gráfico 7. Diferencias en CCR4 y en el ratio CXCR3/CCR4 en pacientes con bronquiolitis moderada o grave según WD.**

### 2.1.7 Pacientes con fiebre

Los pacientes que habían presentado fiebre antes del ingreso (N=20; 40,8%) tenían más edad (215,8 vs 38 días,  $p=0,002$ ), aunque no se encontraron diferencias en cuanto a la duración del ingreso ni del soporte respiratorio. Tampoco presentaban una bronquiolitis más grave según la escala de WD.

Entre los resultados analíticos habituales destacó que los pacientes con fiebre tenían más neutrófilos totales (7.201/ $\mu$ L vs 4.366/ $\mu$ L,  $p=0,016$ ) y niveles más altos de PCR (5,3 mg/dL vs 2,4 mg/dL;  $p=0,034$ ); sin embargo, presentaban menor número de monocitos totales (553/ $\mu$ L vs 1016/ $\mu$ L,  $p=0,005$ ).

En cuanto a los niveles de quimioquinas, no se hallaron diferencias significativas. En cambio, destacó una tendencia preferencial hacia la expresión de CXCR3; además, al analizar CXCR3 en conjunto con CCR4 se observó que el ratio CXCR3/CCR4 mostraba preferencias hacia CXCR3

- CXCR3: 14 vs 10,2 ( $p=0,052$ )
- CXCR3/CCR4: 0,5 vs 0,38 ( $p=0,05$ ).

Sin embargo, los valores de IFN $\gamma$  e IL-4 no mostraron diferencias significativas ni una tendencia estadística clara hacia LTh1, ni tampoco su ratio de expresión.

En el resto de valores de expresión génica no se encontraron diferencias significativas.

#### **2.1.8 Pacientes con apneas**

En el grupo de pacientes que habían presentado apneas como motivo de consulta, destacó que eran de menor edad (27,8 vs 129,2 días,  $p=0,002$ ). No se encontraron diferencias en cuanto al resto de características clínicas ni evolutivas.

En cuanto a los datos de laboratorio, los pacientes con apneas presentaban valores de PCR menores (1,1 vs 4,2;  $p=0,001$ ). El resto de valores de laboratorio, así como los valores de quimioquinas y expresión génica analizados no mostraron diferencias significativas.

#### **2.1.9 Ingreso directo a UCIP**

Del total de la muestra, 15 pacientes fueron ingresados directamente en la UCIP desde el Servicio de Urgencias, el resto (34 pacientes) eran niños que ingresaban en UCIP desde planta de hospitalización (de nuestro propio hospital o como un traslado interhospitalario), es decir, estaba ingresados en el hospital durante algún tiempo (horas o días) antes de ingresar en UCIP.

Ningún dato analizado mostró diferencias significativas entre estos dos grupos, salvo el número total de monocitos, menor en el grupo de pacientes que ingresaban directamente en UCIP (615/ $\mu$ L vs 924/ $\mu$ L,  $p=0,022$ ).

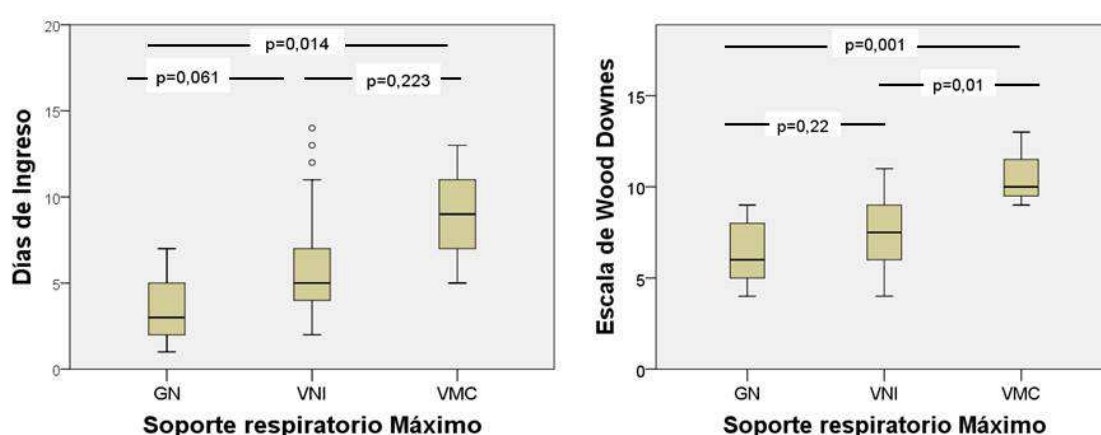
#### **2.1.10 Soporte Respiratorio**

Se analizaron diferentes variables en los pacientes que requirieron un aumento de soporte respiratorio durante el ingreso. No se encontraron diferencias entre estos pacientes respecto a aquellos en los que se mantuvo el mismo soporte durante todo el ingreso.

Con el fin de simplificar el análisis, se agrupó a los pacientes según el soporte respiratorio máximo recibido durante el ingreso y según la modalidad de éste de la siguiente forma: oxigenoterapia simple, VNI (que agrupaba OAF, CPAP y BiPAP) y VMC.

Los pacientes que recibieron soporte con oxigenoterapia simple precisaron menos días de ingreso que los pacientes que requirieron VMC (3 vs 9 días,  $p=0,014$ ). Y aunque esta diferencia también se encontró al compararlos con los pacientes que fueron tratados con VNI, no se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa (3 vs 6,  $p=0,061$ ) (Gráfico 8).

Por otro lado, los pacientes que precisaron VMC presentaban puntuaciones de la escala de WD más altas (11 puntos) respecto a los pacientes que precisaron VNI (7 puntos) y oxigenoterapia simple (6 puntos). En ambos casos estas diferencias fueron significativas ( $p=0,01$  y  $p=0,001$  respectivamente).



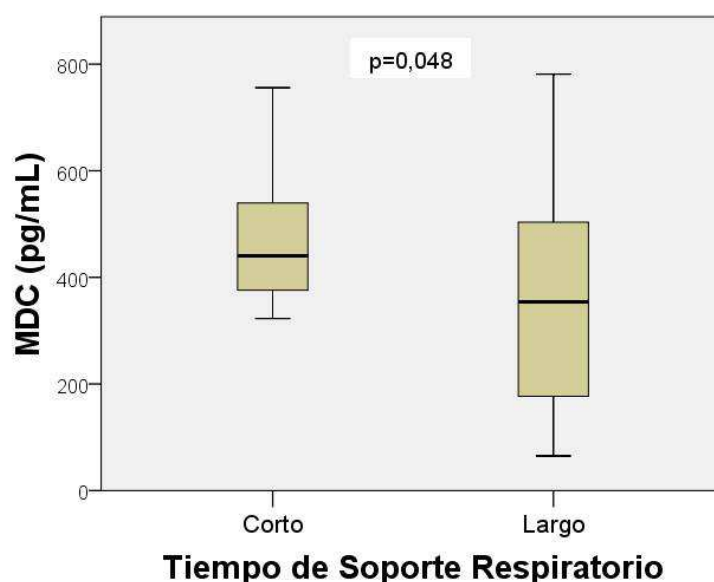
**Gráfico 8. Días de ingreso UCIP y escala de WD al ingreso en UCIP según el soporte respiratorio máximo empleado durante el ingreso.**

Respecto a las variables analíticas, los pacientes que precisaron VMC presentaban en sangre periférica menor número de linfocitos totales ( $1.543/\mu\text{L}$ ) respecto a los pacientes que precisaron GN ( $5.600/\mu\text{L}$ ;  $p=0,026$ ) y los del grupo de VNI ( $4.138/\mu\text{L}$ ;  $0,034$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el resto de variables analíticas habituales entre estos grupos. Tampoco se encontraron en los niveles de quimioquinas ni en los valores de expresión génica.

Dejando de lado los pacientes a los que el único soporte respiratorio que se prestó fueron las GN, se dividió la muestra en aquellos que requirieron el soporte respiratorio (VNI o VMC) durante más horas que la mediana de duración de soporte respiratorio y los que lo precisaron durante menos tiempo. Hubo 21 pacientes que precisaron menos horas de soporte y 18 pacientes que

lo precisaron durante más tiempo. Al analizar posibles diferencias entre estos dos grupos, se encontró que los que superaban el valor mediano eran de menor edad (46,7 vs 120,4 días;  $p=0,05$ ). Sin embargo, no se encontraron diferencias en el resto de parámetros clínicos y tampoco en los analíticos habituales.

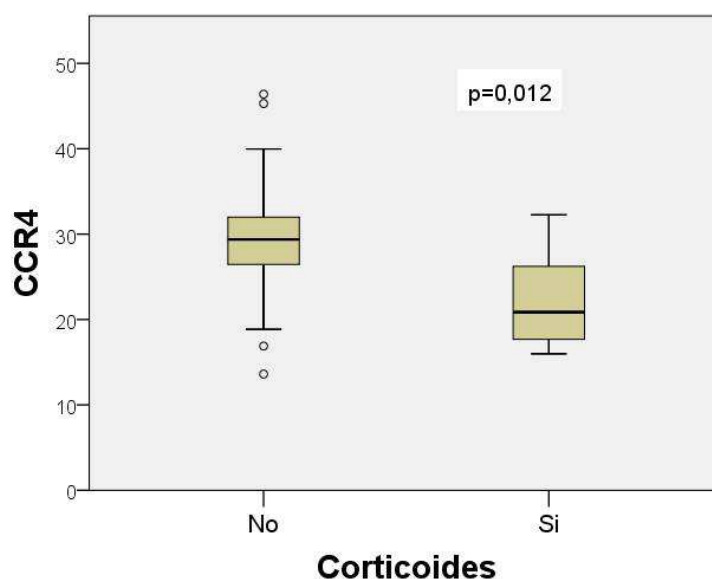
En los pacientes que precisaban menos horas de soporte respiratorio, la quimioquina MDC presentaba valores más elevados respecto al grupo que precisaba durante más tiempo el soporte respiratorio (482,2 vs 352,9 pg/mL;  $p=0,048$ ; Gráfico 9). No se encontraron diferencias en el resto de quimioquinas y receptores de membrana analizados.



**Gráfico 9. Valor mediano de MDC en aquellos pacientes que precisaban menos horas de soporte respiratorio que el valor mediano y los que precisaban más horas.**

### 2.1.11 Empleo de corticoides

Al analizar por separado los pacientes en los que uno de los tratamientos empleados antes del ingreso en UCIP fueron los corticoides, se observó que éstos eran de mayor edad (320 vs 69 días,  $p=0,013$ ), además presentaban menor número de monocitos en sangre periférica (397/ $\mu$ L vs 922/ $\mu$ L,  $p<0,0001$ ) y expresaban en menor medida CCR4 (22 vs 29,  $p=0,012$ ; Gráfico 10). Ninguna otra variable alcanzó la significación estadística.



**Gráfico 10. Valor mediano de CCR4 en aquellos pacientes en los que se había empleado corticoides antes del ingreso.**

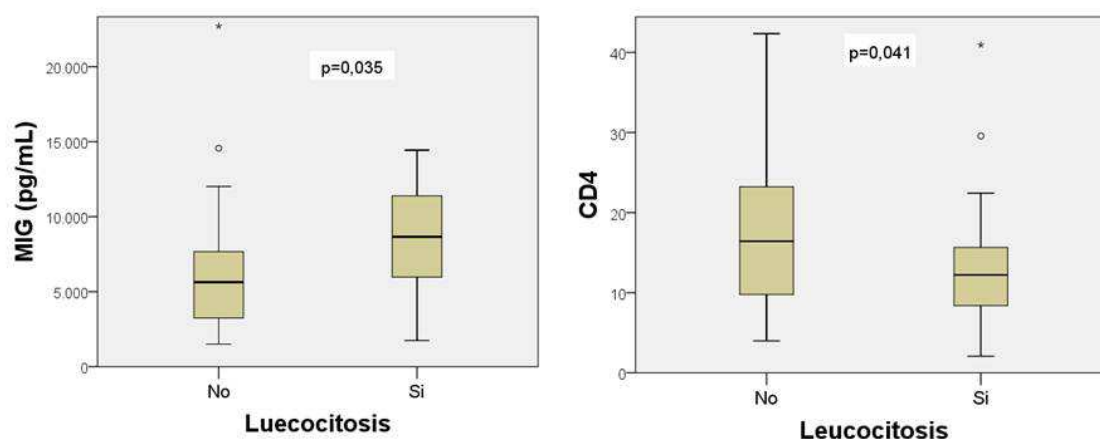
## 2.2. Variables analíticas y microbiológicas habituales

### 2.2.1 Leucocitos

Se dividió la muestra en dos grupos según si el número de leucocitos de cada paciente era mayor o menor que el valor mediana de la muestra (N=25 y N=24, respectivamente). Se encontró que el grupo con un mayor número de leucocitos totales mostraba mayor número de neutrófilos totales (8.138/ $\mu$ L vs 2.799/ $\mu$ L;  $p=0,0001$ ), de linfocitos totales (4.590/ $\mu$ L vs 3.383/ $\mu$ L,  $p=0,05$ ) y de monocitos totales (1.052/ $\mu$ L vs 660/ $\mu$ L,  $p=0,04$ ). No se encontraron otras diferencias respecto al resto de variables clínicas, analíticas ni con las quimioquinas analizadas.

Los pacientes con leucocitosis (valor de leucocitos > 15.000/ $\mu$ L, N=8) mostraron mayor expresión de la quimioquina MIG (10.164 pg/mL vs 6.341 pg/mL;  $p=0,035$ ) y mayor expresión del receptor de membrana CD4, característicos de los LTh (17,2 vs 12,1;  $p=0,041$ ) (Gráfico 11).

Por otro lado, los pacientes leucopénicos (valor de leucocitos < 5.000/ $\mu$ L, N=5) no mostraron ninguna diferencia al compararlos con los pacientes que no presentaban leucopenia.

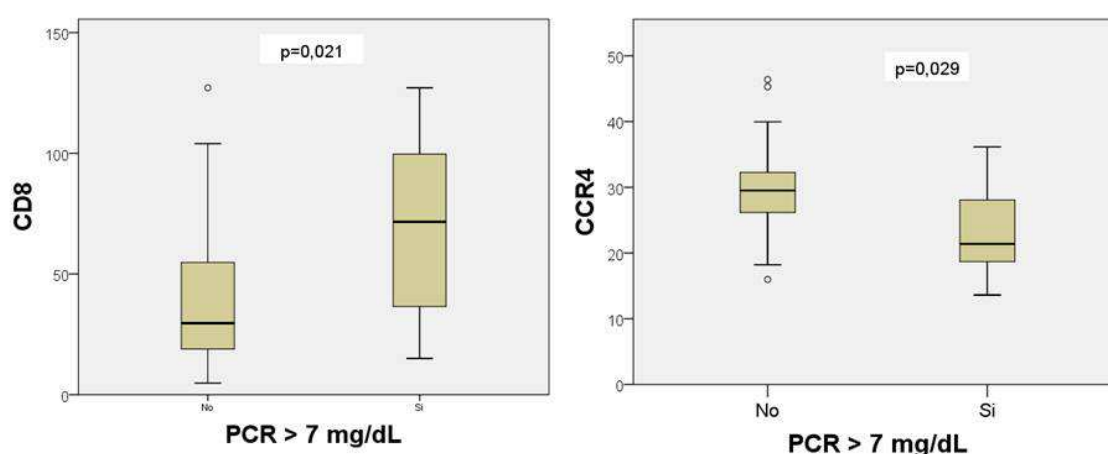


**Gráfico 11. Valores de MIG y de expresión de CD4 en según la presencia de leucocitosis.**

### 2.2.2 Reactantes de fase aguda

Para analizar los reactantes de fase aguda (PCR y PCT) se dividió la muestra en grupos según los valores que habitualmente se asocian a sobreinfección bacteriana.

Por un lado, se dividió la muestra en dos grupos: por un lado, aquellos pacientes que presentaban valores de PCR superiores o iguales a 7 mg/dL (N=8) frente a los que el valor de PCR era inferior a 7 mg/dL (N=40). Se observó que los pacientes con valores altos ( $\text{PCR} \geq 7 \text{ mg/dL}$ ) eran de mayor edad (228,9 vs 89 días;  $p=0,03$ ), aunque este valor no se asoció a otros datos clínicos, de evolución o analíticos habituales.

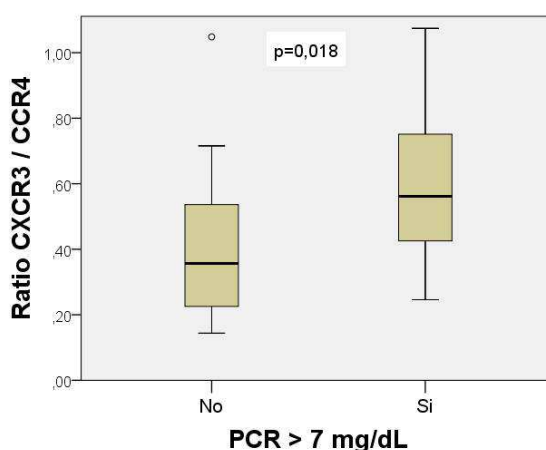


**Gráfico 12. Valores de CD8 y CCR4 según el valor de PCR.**

Entre los otros valores analizados se encontró que los pacientes con PCR alta mostraban mayor expresión génica de CD8 (69,7 vs 40,5;  $p=0,021$ ) y menor de

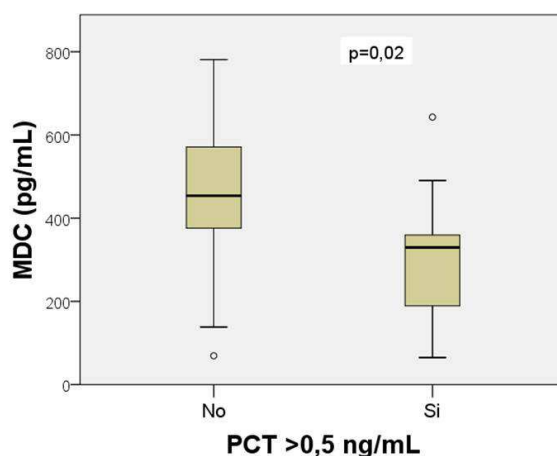
CCR4 (23,3 vs 29,2;  $p=0,029$ ) (Gráfico 12). Además, los pacientes con PCR alta presentaban un ratio CXCR3/CCR4 menos polarizado hacia CCR4 que los que presentaban PCR baja (0,6 vs 0,4;  $p=0,018$ ) (Gráfico 13).

No se encontraron diferencias en el resto de ratios calculados ni en las quimioquinas ni el resto de receptores analizados.



**Gráfico 13. Valor del ratio CXCR3/CCR4 según el valor de PCR.**

Respecto a la PCT, se dividió la muestra entre pacientes con valores altos ( $PCT \geq 0,5$  ng/mL,  $N=12$ ) y los que presentaban valores más bajos ( $N=24$ ). Esta división no encontró diferencias en los valores clínicos ni analíticos habituales. Sin embargo, el grupo de PCT alta presentaba valores de MDC más bajos que el grupo de PCT baja (306,9 vs 470 pg/mL;  $p=0,02$ ) (Gráfico 14). No se encontraron diferencias en el resto de quimioquinas analizadas ni de los valores de expresión génica.



**Gráfico 14. Diferencias en MDC según el valor alto o bajo de PCT**



### 2.2.3 Sobreinfección bacteriana

Se dividió la muestra en dos grupos, aquellos sin datos de sobreinfección bacteriana y aquellos que presentaban una sospecha de sobreinfección (datos analíticos compatibles con cultivos negativos) o una sobreinfección confirmada (cultivo positivo).

De esta forma la muestra quedaba dividida en 24 pacientes sin sospecha de sobreinfección y 25 con sospecha o confirmación.

Al analizar las variables comunes se encontró que los pacientes con sobreinfección bacteriana presentaban bronquiolitis más graves al ingreso según la escala de WD (8 vs 6,7,  $p=0,03$ ) y valores de PCR más elevados (6,1 vs 1,1 mg/dL). No se hallaron diferencias en el resto de variables.

Entre los datos de quimioquinas y expresión génica destacó que los pacientes con sospecha o confirmación de sobreinfección bacteriana presentaban valores de IFN $\gamma$  más altos (67 vs 25,6,  $p=0,04$ ) respecto a los que no estaban sobreinfectados (Gráfico 15). Sin embargo, estos resultados no influyeron en el ratio IFN $\gamma$ /IL-4 ni se hallaron diferencias en los valores de CXCR3 y CCR4.

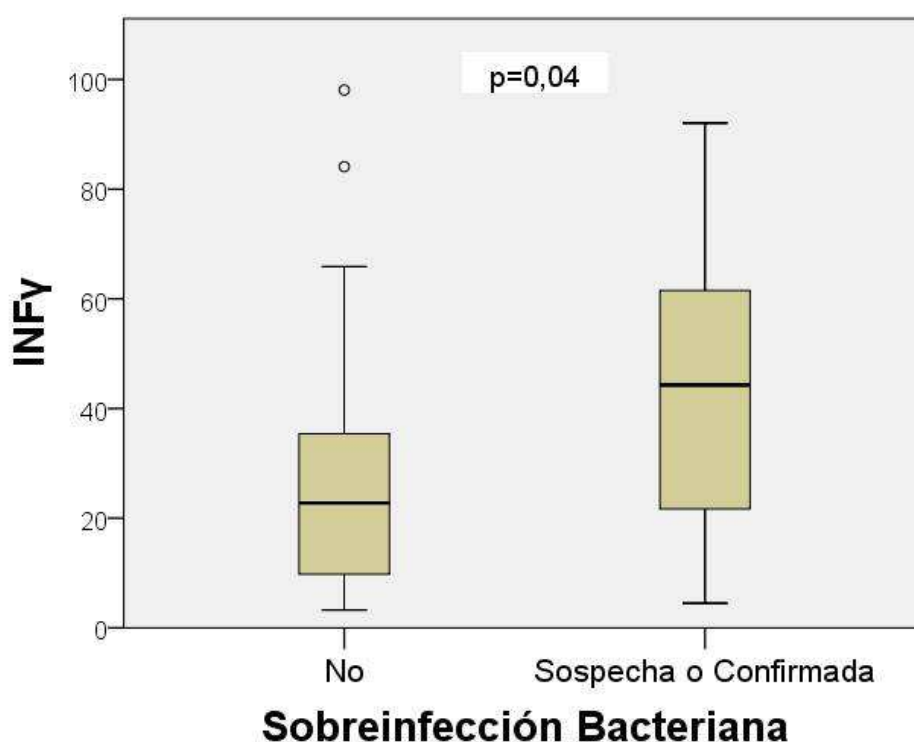


Gráfico 15. Valor de IFN $\gamma$  según los datos de sobreinfección bacteriana.

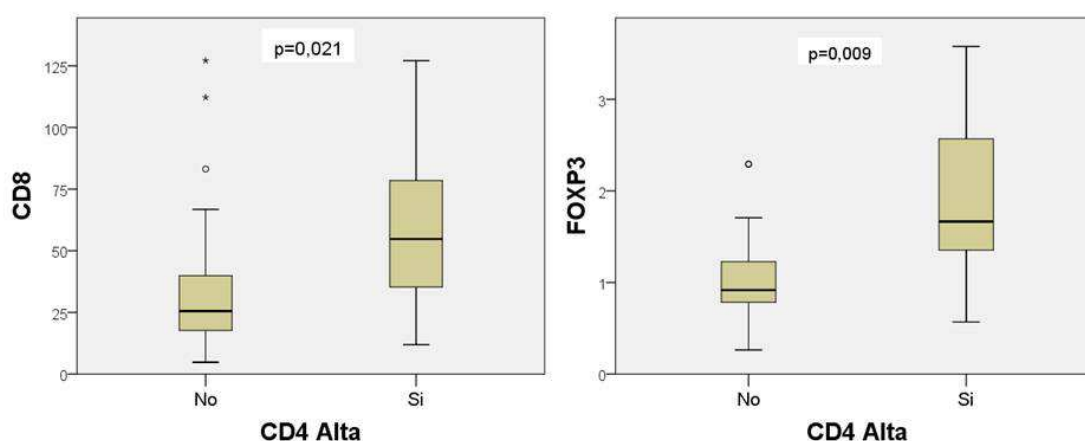
## 2.3. Inmunofenotipo

### 2.3.1 Subtipos de LT

Se dividió la muestra entre aquellos pacientes que presentaban valores de CD4 y CD8 por encima y por debajo de la mediana de dichas variables.

Respecto a los pacientes con expresión alta de CD4, no se encontraron diferencias en las variables clínicas y de laboratorio habituales respecto a los que la presentaban baja.

Se observó que los pacientes con valores altos de expresión de CD4 también expresaban en mayor medida CD8 (57,2 vs 35,3;  $p=0,021$ ) y FOXP3 (2,6 vs 1,1;  $p=0,009$ ) (Gráfico 16). No se encontraron diferencia en el resto de valores de expresión génica analizados ni en las quimioquinas ni en sus receptores.

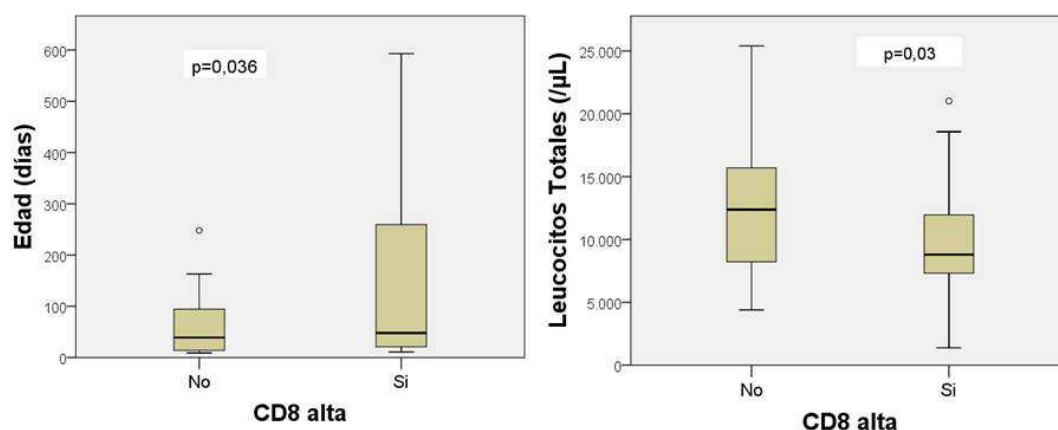


**Gráfico 16. Valor de CD8 y FOXP3 en pacientes con valores de expresión de CD4 mayores y menores que el valor mediano**

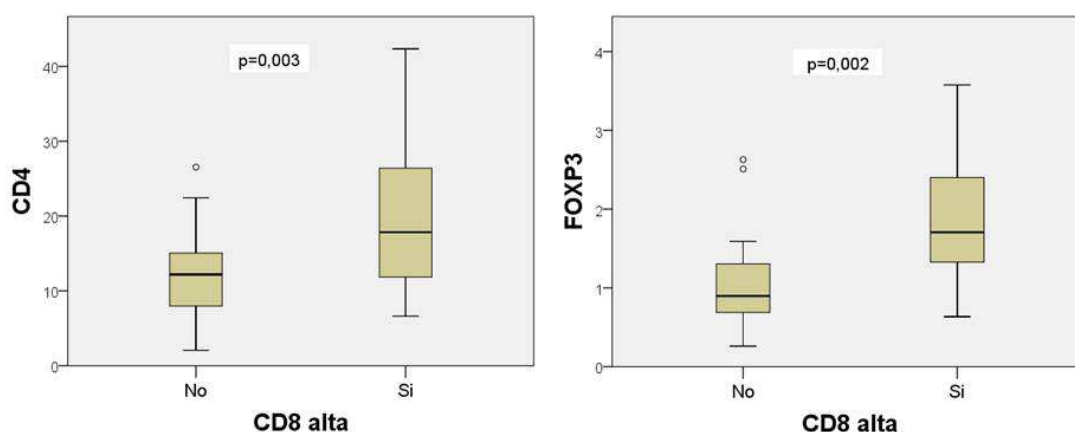
En cuanto a los pacientes que presentaban valores de CD8 por encima del valor mediano se encontró que los pacientes con valores altos de CD8 eran de mayor edad que los que presentaban valores más bajos (168,7 vs 61,8 días;  $p=0,036$ ). Además, estos pacientes con valores altos de CD8 presentaban menor número de leucocitos totales (9.349/ $\mu$ L vs 12,629/ $\mu$ L;  $p=0,03$ ) (Gráfico 17); estas diferencias no se encontraron en el número de neutrófilos ni de linfocitos ni de monocitos. El resto de variables clínicas y analíticas habituales no presentaban diferencias.

Los pacientes con valores altos de CD8 presentaba valores de expresión más altos de CD4 (20,1 vs 12,1;  $p=0,003$ ) así como de FOXP3 (2,4 vs 1,01;  $p=0,009$ ) (Gráfico 18). Además, se encontró que el ratio de expresión CD8/CD4 presentaba mayor valor en los pacientes con CD8 alta (5 vs 2;  $p=0,002$ ).

Las quimioquinas y sus receptores no mostraron diferencias significativas en los pacientes con valores altos de CD8.



**Gráfico 17. Días de ingreso y número total de leucocitos en sangre periférica en aquellos pacientes que presentaba valores de CD8 por encima del valor mediano.**



**Gráfico 18. Valor de CD4 y FOXP3 en pacientes que presentaba valores de CD8 por encima del valor mediano.**

Al analizar el cociente de expresión génica CD4/CD8, se observó que aquellos pacientes con cocientes más polarizados hacia CD4 requerían más días de ingreso en UCIP (9,17 vs. 4,88;  $p=0,001$ ) y una tendencia a precisar más horas de soporte respiratorio (183,5 vs. 97,1;  $p=0,095$ ). El resto de variables no alcanzó la significación estadística.

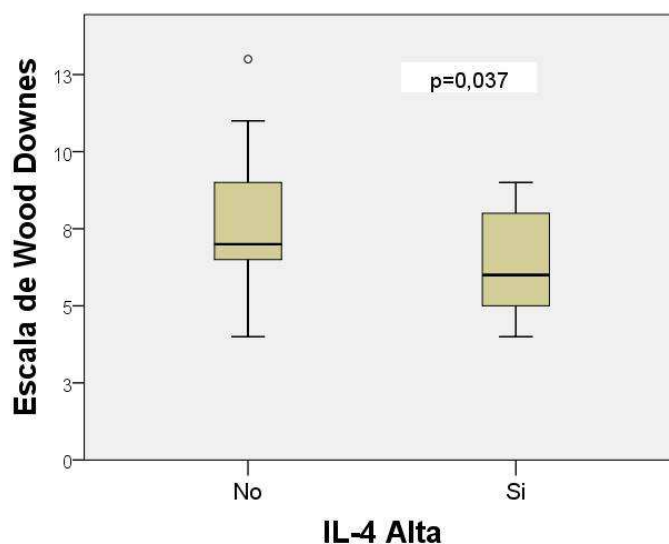
### 2.3.2 Subtipos de LT helper

Se analizó la muestra dividiendo a los pacientes entre aquellos que presentaban valores de IFN $\gamma$  (LTh1), IL-4 (LTh2) y FOXP3 (LTreg) por encima del valor mediana y los que no.

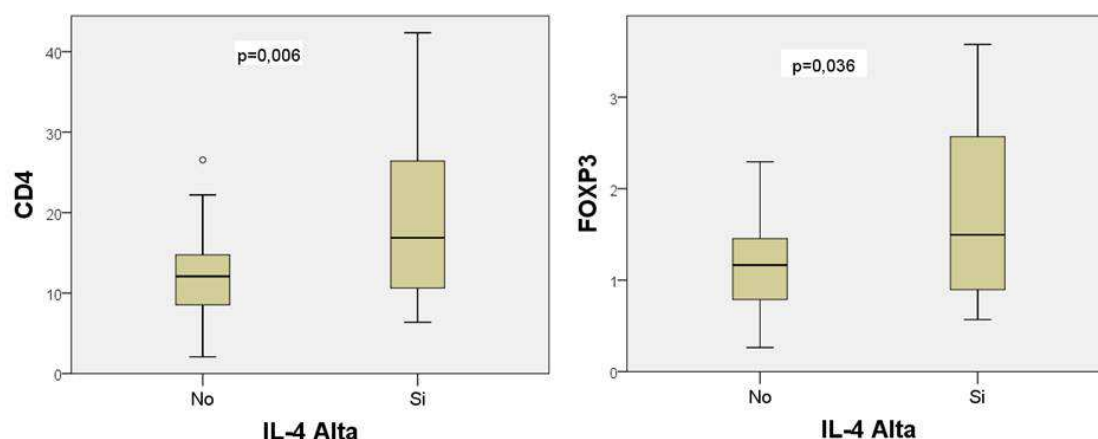
Al analizar a los pacientes con valores altos de expresión de IFN $\gamma$  se encontró un ratio de polarización IFN $\gamma$ /IL-4 con mayor polarización hacia IFN $\gamma$  (55 vs 9,8;  $p=0,01$ ). Además, los pacientes con valores altos de IFN $\gamma$  presentaban en sangre menor número de monocitos totales (640/ $\mu$ L vs 1.127/ $\mu$ L,  $p=0,014$ ); estas diferencias no se encontraron en el número total de leucocitos, linfocitos y neutrófilos totales.

Los pacientes con valores altos de IL-4 presentaban bronquiolitis menos graves según la escala de WD (6,7 vs 7,9;  $p=0,037$ ) (Gráfico 19). No se encontraron diferencias en el resto de las variables clínicas y analíticas habituales analizadas.

Los pacientes con valores altos de IL-4 presentaban mayor expresión génica de CD4 (19,7 vs 12,1,  $p=0,006$ ) así como de FOXP3 (2,3 vs 1,2;  $p=0,036$ ) (Gráfico 20). No se encontraron diferencias en el resto de valores analizados.



**Gráfico 19. Valor de escala de WD en los pacientes con valores de IL-4 por encima del valor mediano.**

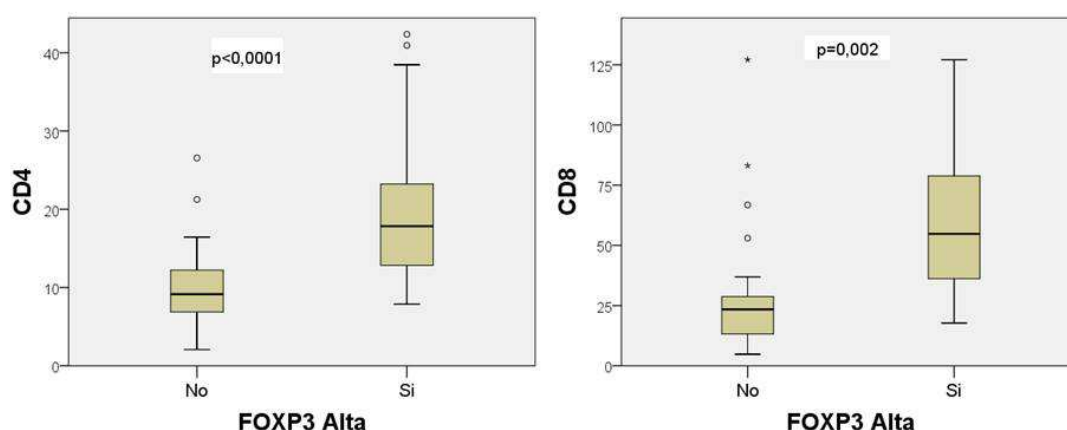


**Gráfico 20. Diferencia en CD4 e FOXP3 en los pacientes con valores de IL-4 por encima del valor mediano.**

Se observó que los pacientes con valores altos de IL-4 presentaban un ratio de polarización  $\text{IFN}\gamma/\text{IL-4}$  que aunque seguía estando polarizado hacia  $\text{IFN}\gamma$ , como en la mayoría de los pacientes, lo estaba en menor medida (12,4 vs 54,3;  $p=0,016$ ).

Al analizar a los pacientes que presentaban valores de FOXP3 por encima del valor mediana y los que no, se encontró que los pacientes con expresión FOXP3 alta presentaban mayor expresión de CD4 (20,9 vs 10,4;  $p<0,0001$ ) y de CD8 (59,6 vs 30,6;  $p=0,002$ ) (Gráfico 21).

No se encontraron diferencias en las variables clínicas habituales ni en los datos de laboratorio. Tampoco se observaron diferencias en las quimioquinas analizadas ni en sus receptores.



**Gráfico 21. Diferencia en CD4 y CD8 en los pacientes con valores de FOXP3 por encima del valor mediano.**

## 2.4. Quimioquinas y sus receptores

### 2.4.1 Quimioquinas específicas de LTh

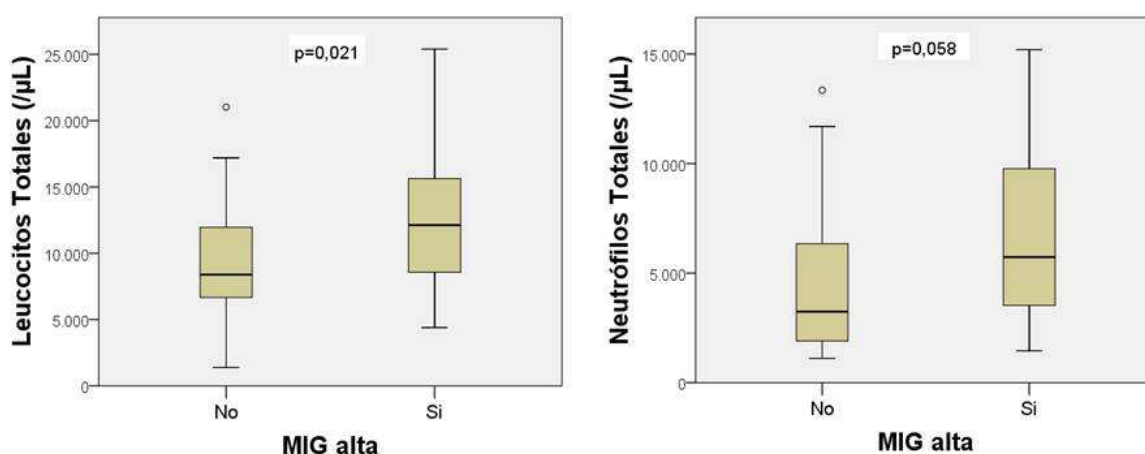
Para poder realizar comparaciones se dividió la muestra entre aquellos pacientes que presentaban valores por encima y por debajo del valor mediano de las diferentes quimioquinas.

#### 2.4.1.1 IP-10

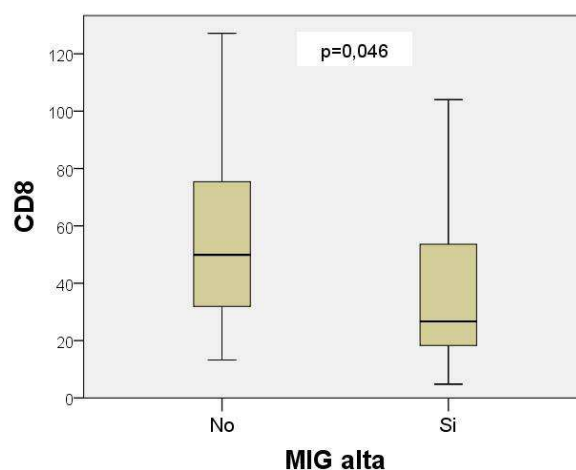
Los pacientes con IP-10 alta no mostraron diferencias significativas en las diferentes variables analizadas.

#### 2.4.1.2 MIG

Los pacientes con MIG alta presentaban mayor número de leucocitos totales (12.617/ $\mu$ L vs 9.170/ $\mu$ L;  $p=0,021$ ) y una tendencia a presentar mayor número de neutrófilos totales aunque ésta no alcanzó la significación estadística (6.625/ $\mu$ L vs 4.498/ $\mu$ L;  $p=0,058$ ) (Gráfico 22); no se observó esa tendencia en el número de linfocitos y monocitos totales. Además, estos pacientes con MIG alta, presentaban menor expresión de CD8 (37,4 vs 56,7;  $p=0,046$ ) (Gráfico 23).



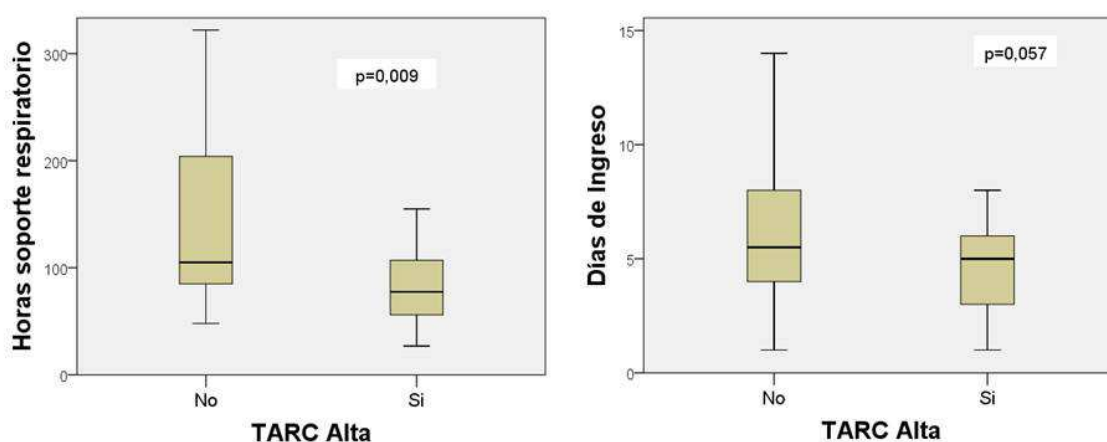
**Gráfico 22. Valor de leucocitos y neutrófilos totales en pacientes con MIG por encima del valor mediano.**



**Gráfico 23.** Diferencia en CD8 en pacientes con MIG por encima del valor mediano.

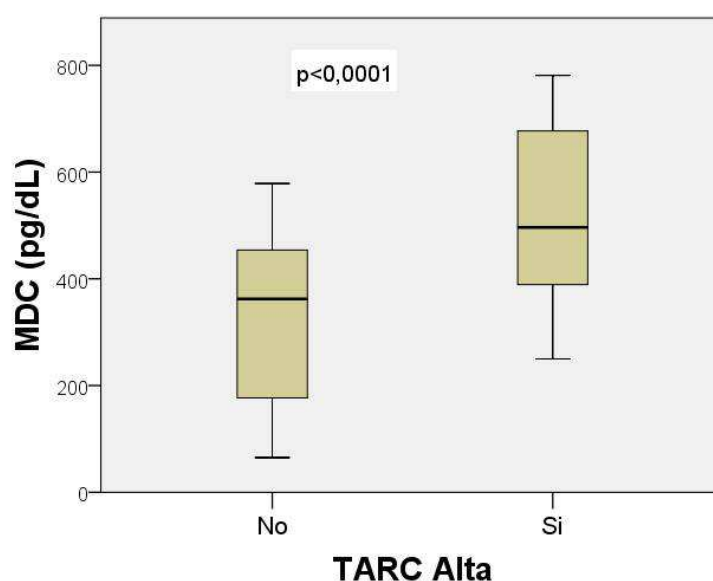
### 2.4.1.3 TARC

Los pacientes con TARC alta precisaban menos horas de soporte respiratorio (81,7 vs 143,6;  $p=0,009$ ) y tenían tendencia a necesitar menos días de ingreso (4,6 vs 6,3;  $p=0,057$ ) (Gráfico 24). Además, presentaban valores menores de PCR (2,3 mg/dL vs 5,1 mg/dL;  $p=0,045$ ).



**Gráfico 24.** Horas de soporte respiratorio y días de ingreso en pacientes con TARC por encima del valor mediano.

Entre las quimioquinas analizadas se observó que los pacientes con valores altos de TARC presentaban también valores más altos de MDC (524,6 pg/mL vs 337,7 pg/mL;  $p<0,0001$ ) (Gráfico 25). También se encontró que los pacientes con valores altos de TARC presentaban un ratio CD8/CD4 polarizado hacia CD8 pero en menor medida que los pacientes con valores bajos de TARC (2,5 vs 4,5;  $p=0,044$ ).

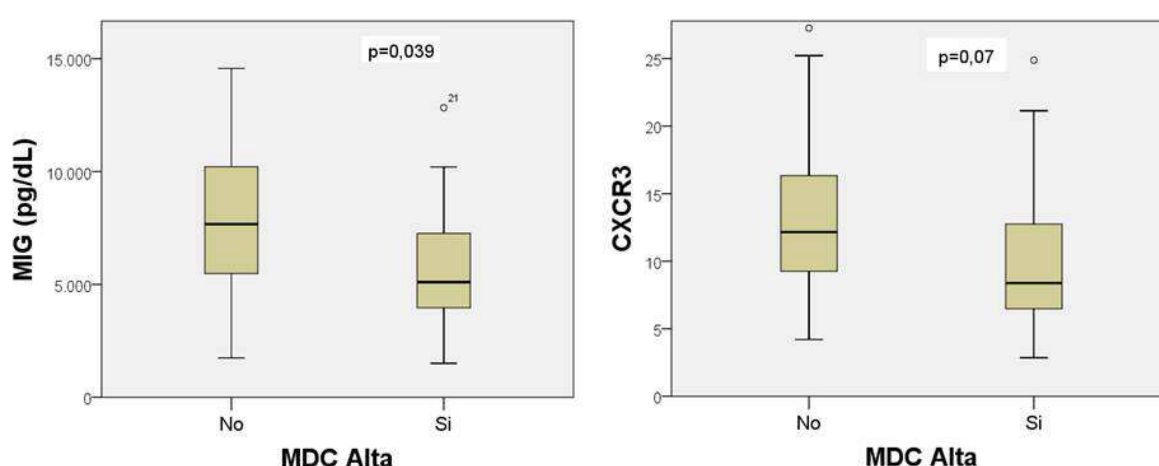


**Gráfico 25. Valor de MDC en pacientes con TARC por encima del valor mediano.**

#### 2.4.1.4 MDC

Respecto a MDC, no se encontraron diferencias en las variables clínicas y analíticas habituales.

Se encontró que los pacientes con valores altos de MDC presentaban valores menores de MIG (5.730 pg/mL vs 9.009 pg/mL;  $p=0,039$ ). Además, se encontró una tendencia a presentar menor expresión de CXCR3 (10 vs 13,4;  $p=0,07$ ) en los pacientes con MDC alta (Gráfico 26). El resto de quimioquinas y parámetros analizados no mostraron diferencias significativas.



**Gráfico 26. Valor de MIG y CXCR3 en pacientes con valor de MDC por encima del valor mediano.**



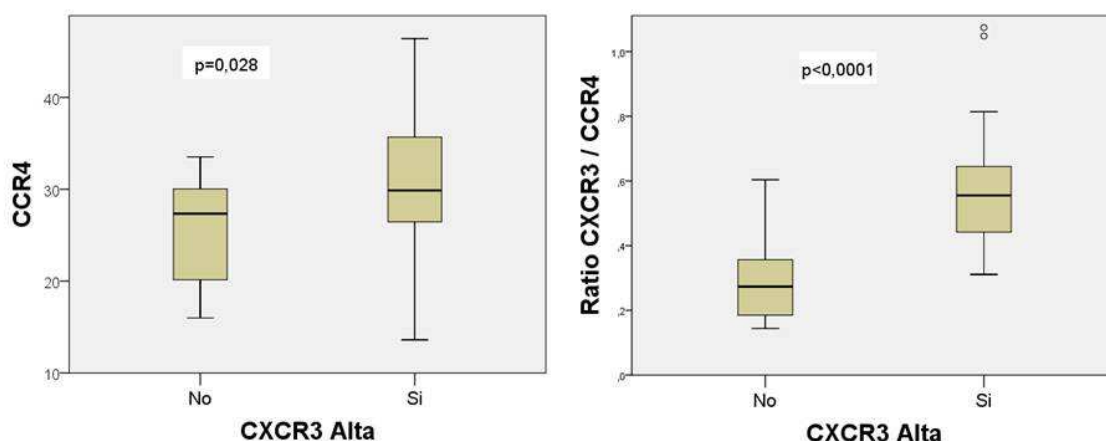
### 2.4.2 Expresión génica de receptores de quimioquinas específicos de LTh

De igual forma que con las quimioquinas, se dividió la muestra entre aquellos que presentaban valores mayores y aquellos que los presentaban menores respecto del valor mediano de los receptores de quimioquinas analizados.

#### 2.4.2.1 CXCR3

No se encontraron diferencias en las variables clínicas y analíticas habituales.

Los pacientes con valores altos de expresión de CXCR3 presentaban también valores altos de expresión de CCR4 (30,3 vs 25,7;  $p=0,028$ ). Además, en los pacientes con CXCR3 alta el ratio de expresión CXCR3/CCR4 presentaba una polarización menos marcada hacia CCR4 que los que presentaban valores más bajos (0,58 vs 0,29;  $p=0,0001$ ) (Gráfico 27).



**Gráfico 27. Valores de CCR4 y ratio CXCR3 en pacientes con valor de CXCR3 por encima del valor mediano.**

#### 2.4.2.2 CCR4

No se encontraron diferencias en las variables clínicas y analíticas habituales.

Los pacientes con valores altos de CCR4 presentaban valores altos de expresión de CXCR3 cercanos a la significación estadística (13,6 vs 10,2;  $p=0,065$ ) así como menores de CD8 (37,2 vs 54,4;  $p=0,071$ ).

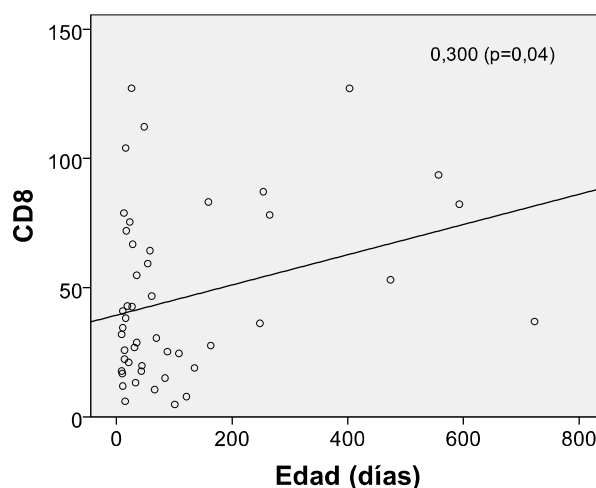
### 3. Correlaciones

Se compararon las variables cuantitativas (clínicas, analíticas habituales, quimioquinas y valores de expresión génica) para encontrar correlaciones entre ellas.

#### 3.1 Variables clínicas y analíticas habituales

##### 3.1.1 Edad

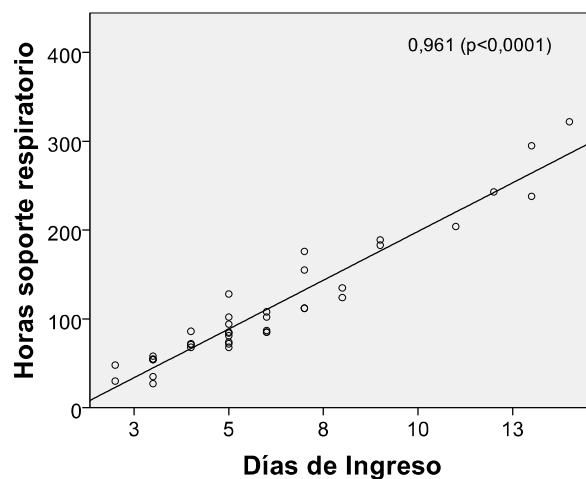
Se observó que la edad se correlacionaba de forma negativa con los días de ingreso ( $-0,37$ ;  $p=0,009$ ), y de forma positiva con los neutrófilos totales ( $0,338$ ;  $p=0,017$ ) y la PCR ( $0,309$ ;  $p=0,32$ ). La edad no mostró ninguna correlación con las quimioquinas analizadas. Sin embargo, se encontró una correlación positiva entre la edad y la expresión de CD8 ( $0,300$ ;  $p=0,04$ ) (Gráfico 28).



**Gráfico 28. Correlación entre la edad y los valores de expresión de CD8; a mayor edad, mayor expresión de CD8.**

##### 3.1.2 Días de ingreso

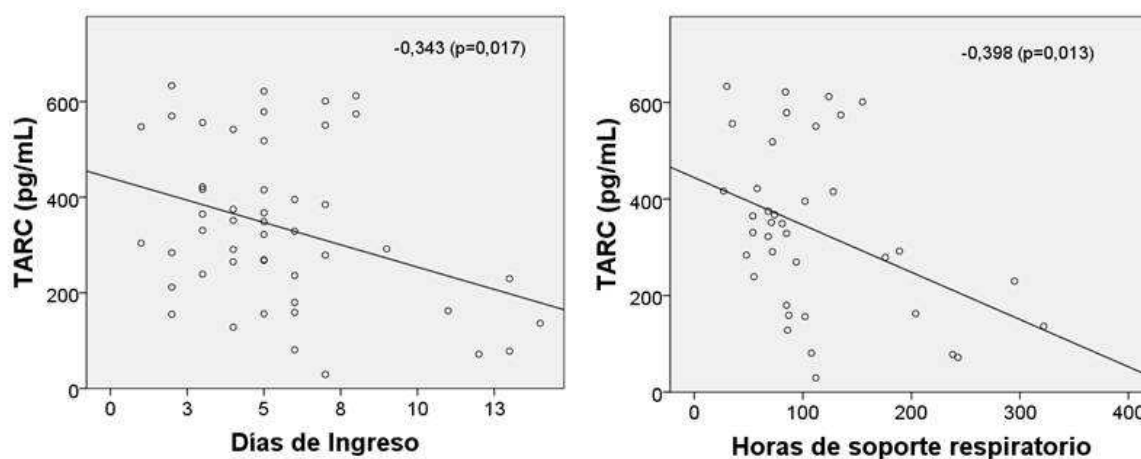
Además de correlacionarse con la edad del paciente, los días de ingreso se correlacionaron con las horas de soporte respiratorio ( $0,961$ ;  $p<0,0001$ ; Gráfico 29), con los leucocitos totales ( $-0,385$ ;  $p=0,006$ ), los neutrófilos totales ( $-0,293$ ;  $p=0,041$ ) y los niveles de TARC ( $-0,343$ ;  $p=0,017$ ) (Gráfico 30).



**Gráfico 29. Correlación entre los días de ingreso con las horas de soporte respiratorio.**

### 3.1.3 Soporte respiratorio

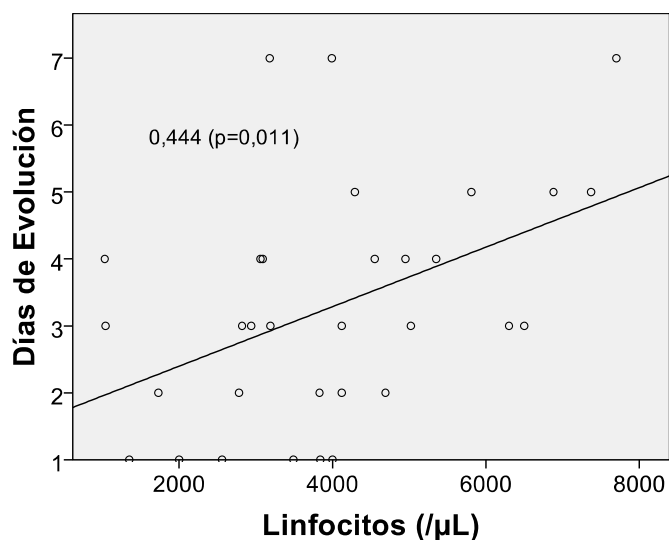
El tiempo de soporte respiratorio se correlacionó, además de con los días de ingreso, con los niveles de TARC (-0,398;  $p=0,013$ ) (Gráfico 30).



**Gráfico 30. Correlación entre TARC con los días de ingreso y las horas de soporte respiratorio**

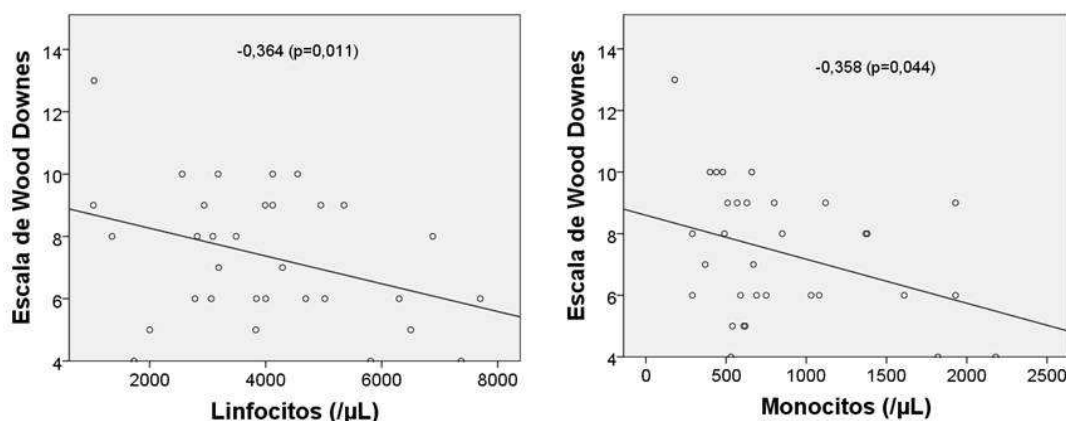
### 3.1.4 Días de evolución y Escala de WD

Se observó una correlación entre los linfocitos totales y los días de evolución (0,444;  $p=0,011$ ) (Gráfico 31).



**Gráfico 31. Correlación entre el número total de linfocitos en sangre periférica y los días de evolución de la clínica.**

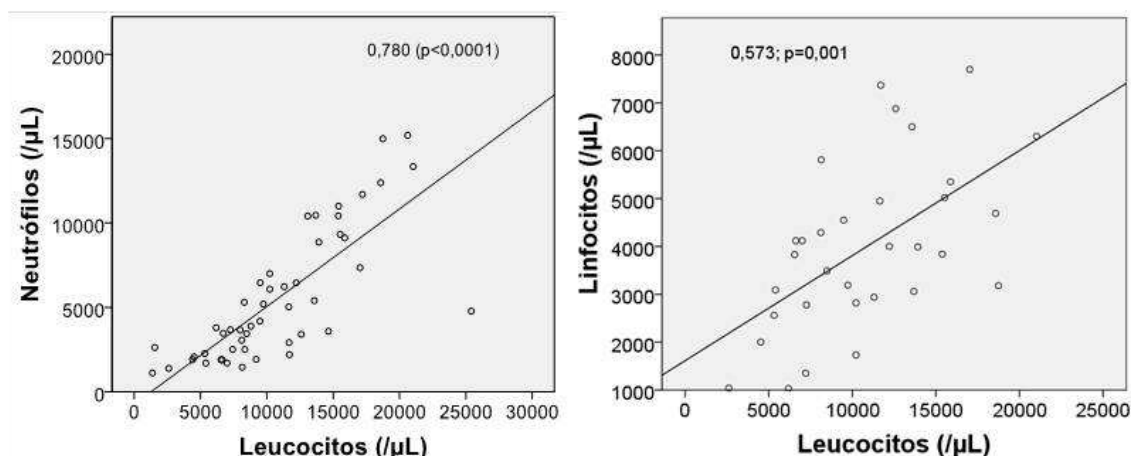
La gravedad según la escala de WD mostró una correlación negativa entre los linfocitos totales (-0,364;  $p=0,04$ ) y los monocitos totales en sangre periférica (-0,358; 0,044) (Gráfico 32). Sin embargo, no se observó ninguna otra correlación respecto al resto de variables analizadas.



**Gráfico 32. Correlación entre la escala de WD y los linfocitos y monocitos en sangre periférica.**

### 3.1.5 Leucocitos, neutrófilos, linfocitos y monocitos totales

Además de las correlaciones antes mencionadas, los leucocitos totales mostraron correlación con los neutrófilos (0,780;  $p<0,0001$ ) y con los linfocitos (0,573;  $p=0,001$ ) (Gráfico 33).

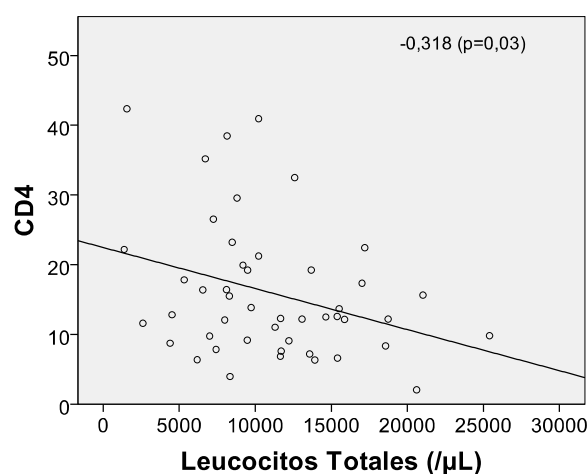


**Gráfico 33. Correlación entre leucocitos con neutrófilos y linfocitos totales en sangre periférica**

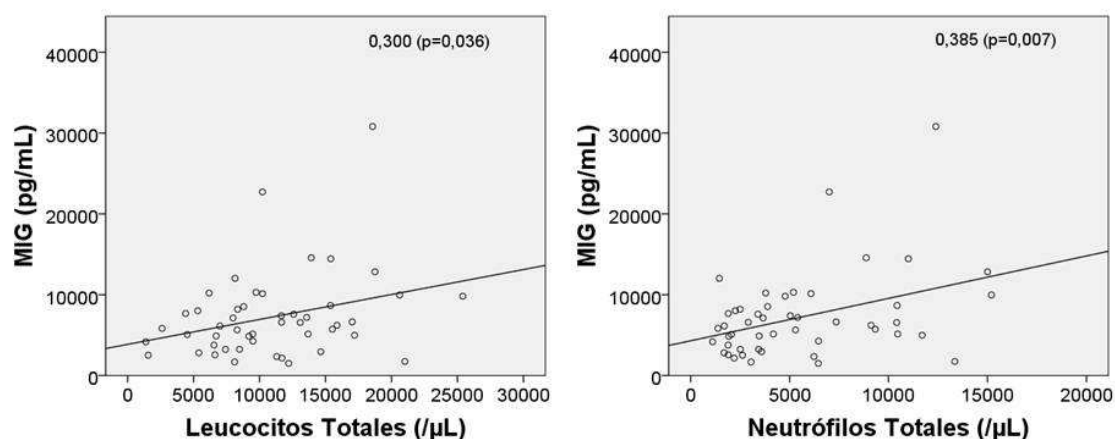
No obstante, los neutrófilos y los linfocitos no mostraron correlación entre ellos. Los monocitos no mostraron correlación con ninguna de estas células del sistema inmune analizadas.

Los leucocitos totales en sangre periférica mostraron correlaciones con los niveles de expresión de CD4 ( $-0,318$ ;  $p=0,03$ ) (Gráfico 34) y con los de MIG ( $0,300$ ;  $p=0,036$ ). Sin embargo, los neutrófilos totales solo se correlacionaron con los niveles de MIG ( $0,385$ ;  $p=0,007$ ) (Gráfico 35).

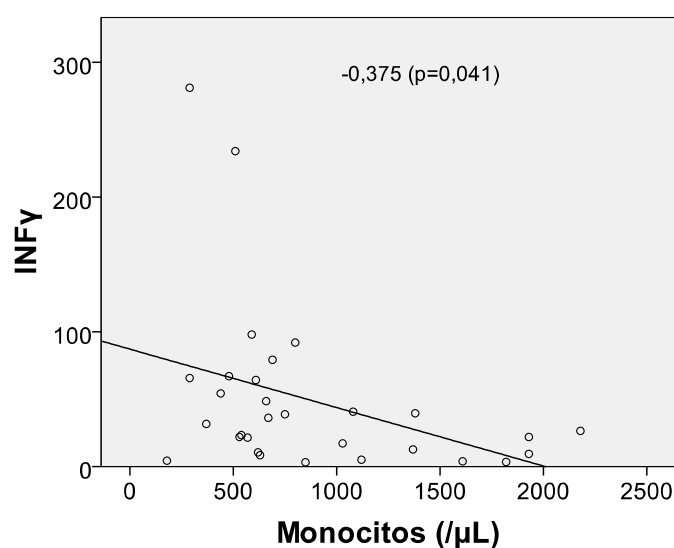
Los linfocitos no mostraron ninguna correlación más además de las mencionadas anteriormente. Sin embargo, los monocitos mostraron correlación con los niveles de IFN $\gamma$  ( $-0,375$ ;  $p=0,041$ ) (Gráfico 36).



**Gráfico 34. Correlación entre los leucocitos totales en sangre periférica y la expresión génica de CD4**



**Gráfico 35. Correlación entre leucocitos y neutrófilos en sangre periférica y MIG**

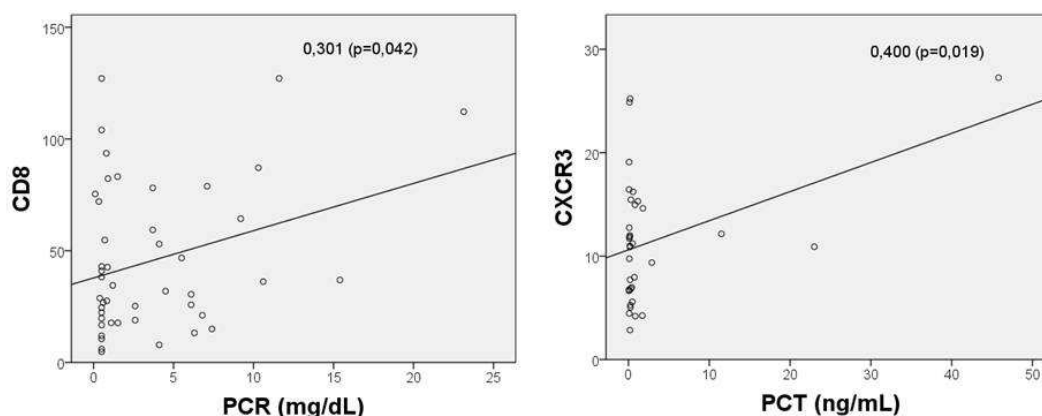


**Gráfico 36. Correlación entre monocitos en sangre periférica y los niveles de expresión génica de IFN $\gamma$**

### 3.1.6 Reactantes de fase aguda

Además de con la edad, la PCR se correlacionó con el valor de expresión génica de CD8 (0,301;  $p=0,042$ ).

Por otro lado, la PCT solo se correlacionó con los niveles de expresión génica de CXCR3 (0,400;  $p=0,019$ ) (Gráfico 37).

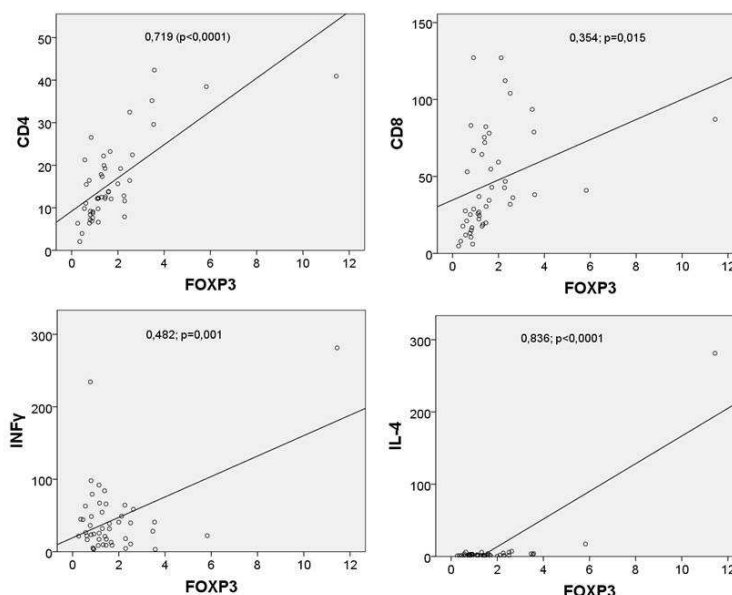


**Gráfico 37. Correlación entre PCR y CD8 y PCT y CXCR3**

### 3.2 Inmunofenotipo

La expresión génica de CD4, además de con las variables descritas en el apartado anterior, mostraba correlaciones con CD8 (0,336,  $p=0,021$ ), FOXP3 (0,719;  $p<0,0001$ ) e IL-4 (0,416;  $p=0,004$ ). También se encontró una correlación entre la expresión de CD8 y FOXP3 (0,354;  $p=0,015$ ).

FOXP3, además de con CD4 y CD8, mostraba correlación con IP-10 (0,327;  $p=0,027$ ), IFN $\gamma$  (0,482;  $p=0,001$ ) e IL-4 (0,836;  $p<0,0001$ ) (Gráfico 38).

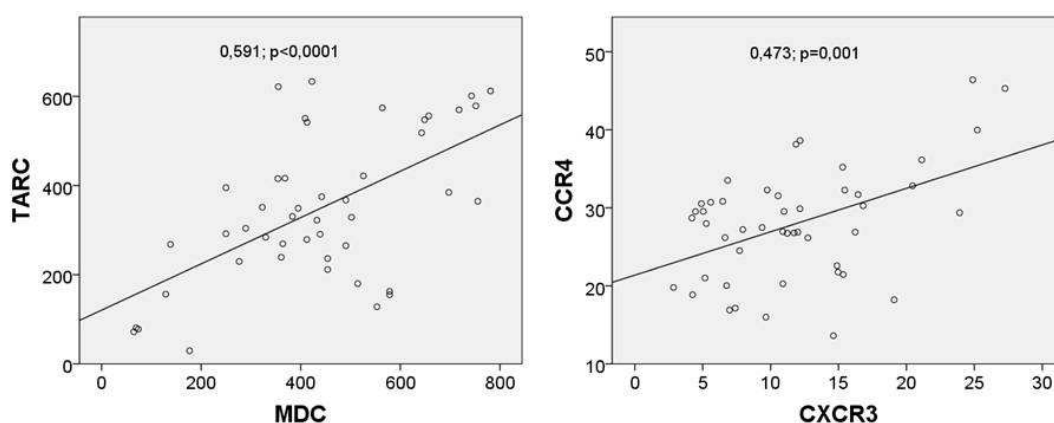


**Gráfico 38. Correlaciones de FOXP3 con los diferentes marcadores linfocitarios (CD4, CD8, IFN $\gamma$  e IL-4)**

Los niveles de expresión de IFN $\gamma$  e IL-4 se correlacionaban entre ellos (0,676;  $p<0,0001$ ).

### 3.3 Quimioquinas y receptores de quimioquinas

Al analizar las posibles correlaciones entre las diferentes quimioquinas se observó que solo TARC y MDC mostraban una correlación significativa entre ellas (0,591;  $p < 0,0001$ ). El resto de correlaciones analizadas entre las diferentes quimioquinas y sus receptores no alcanzaron la significación estadística. Sin embargo, CXCR3 y CCR4 sí mostraron una correlación entre ellos (0,473;  $p = 0,001$ ) (Gráfico 39).



**Gráfico 39. Representación de las correlaciones significativas entre las quimioquinas y sus receptores**

Al analizar la relación de las quimioquinas con el resto de valores de expresión génica se encontraron las siguientes correlaciones:

- IP-10 mostró correlación con FOXP3 (0,327;  $p = 0,027$ ), IFN $\gamma$  (0,300;  $p = 0,042$ ) e IL-4 (0,314;  $p = 0,033$ ).
- MIG se correlacionó con IFN $\gamma$  (0,502;  $p < 0,0001$ ) e IL-4 (0,438;  $p = 0,002$ ).
- TARC mostró correlación con IFN $\gamma$  (0,334;  $p = 0,023$ ).
- MDC no se correlacionó con ninguna de estas variables analizadas.

Tanto CXCR3 como CCR4 no mostraron ninguna correlación significativa con el resto de parámetros de expresión génica analizados.



# DISCUSIÓN

---

En el presente trabajo se ha analizado una muestra de pacientes ingresados por bronquiolitis en UCIP. Además de evaluar las características epidemiológicas y clínicas habituales, se ha estudiado el patrón de respuesta inmune de cada individuo y su relación con dichas variables clínicas.

El análisis de la respuesta inmune se ha basado, por un lado, en marcadores clásicos de inflamación (hemograma, PCR, PCT) pero además se ha investigado la expresión génica de marcadores de respuesta inmune linfocitaria, en primer lugar CD4 y CD8, como marcadores de respuestas LTh y LTc respectivamente, y en segundo lugar IFN $\gamma$  e IL4 como marcadores específicos de LTh1 y LTh2<sup>70,72</sup>. Como marcador de los LTreg se ha analizado FOXP3<sup>80</sup>.

Se ha completado el estudio de respuesta de LTh analizando los niveles de expresión génica de CXCR3, receptor específico de las quimioquinas IP-10 y MIG, y CCR4, receptor específico de TARC y MDC. En estudios anteriores se ha comprobado la expresión preferencial en linfocitos LTh1 y LTh2 respectivamente<sup>87,124</sup>. Para finalizar, se ha analizado la concentración de estas quimioquinas circulantes en sangre periférica. De esta forma se ha obtenido una visión completa sobre la interacción quimioquina-receptor.

Existen pocos estudios sobre bronquiolitis que hayan investigado la asociación de variables clínicas con datos de respuesta inmune, por lo que el presente estudio resulta novedoso. Algunos de los hallazgos que se comentarán a continuación contradicen la literatura existente, mientras que otros apoyan lo publicado hasta el momento; además, algunos hallazgos del presente trabajo no habían sido publicados con anterioridad.

El análisis de expresión génica se ha realizado mediante la reacción en cadena de la polimerasa sobre ácido desoxirribonucleico obtenido a partir de ácido ribonucleico mensajero, lo que permite conocer el valor absoluto de expresión de cada gen en cada sujeto de la muestra y por tanto de un marcador determinado. Esto ha permitido analizar la relación entre ellos y estimar que

tipo de respuesta linfocitaria predomina en cada paciente. De esta forma, el presente estudio va un paso más allá del simple análisis de unas variables clínicas y pretende aportar conocimiento sobre la fisiopatología de la respuesta inmune en pacientes con bronquiolitis grave. Los hallazgos encontrados en este estudio deberían servir de punto de partida para investigaciones futuras que diluciden qué ocurre en un individuo con bronquilitis.

A continuación se discuten los resultados más importantes.

## 1. Características clínicas y epidemiológicas

La muestra obtenida durante el periodo de estudio representa el tipo de paciente que habitualmente ingresa UCIP por una bronquiolitis aguda<sup>8</sup>. Respecto a la muestra a estudio, el único dato epidemiológico en el que se encontraron diferencias fue el sexo de los pacientes, predominando el ser varón, además estos eran de menor edad respecto a las niñas. En alguna ocasión ha sido publicado que los varones tienen más riesgo de padecer una bronquiolitis grave<sup>129,130</sup>. Se puede afirmar que los varones presentan bronquiolitis más graves ya que éstos ingresan con más frecuencia en UCIP para el tratamiento de una bronquiolitis aguda. Sin embargo, no creemos que el ser varón suponga un sesgo al analizar el resto de resultados ya que no se hallaron diferencias en el resto de variables epidemiológicas, clínicas ni analíticas analizadas respecto al sexo.

La mayoría de los pacientes estudiados no presentaba ningún antecedente de interés. La UCIP del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús carece de unidad neonatal específica y no se realiza cirugía cardíaca. Como es sabido, tanto las cardiopatías<sup>131</sup> como la prematuridad<sup>132</sup> son factores de riesgo para padecer una bronquiolitis grave. No existen datos publicados en la literatura sobre si los pacientes crónicos acuden a su hospital de referencia ante un cuadro de bronquiolitis aguda (antiguos prematuros, pacientes con cardiopatías intervenidas) o por el contrario acuden a cualquier otro centro hospitalario. La elección preferente de un hospital u otro por el paciente podría suponer un sesgo de selección, sin embargo, y aunque los factores de riesgo descritos en la introducción suponen un motivo para padecer una bronquiolitis grave, la

mayoría de los estudios epidemiológicos sobre bronquiolitis aguda concluyen que el paciente tipo que padece una bronquiolitis grave es un niño sano de corta edad (en general menores de 5-6 meses)<sup>13</sup> como es el caso de esta serie.

Sin embargo, como era de esperar, los pacientes del estudio que presentaban antecedentes de interés eran claramente de mayor edad que los pacientes sanos. El hecho de padecer una condición preexistente a la bronquiolitis confiere una vulnerabilidad especial a estos pacientes durante la mayor parte de su infancia, lo que justificaría su mayor edad al compararlo con niños sanos que padecen una bronquiolitis. Estos resultados son similares a los de diversos estudios<sup>9</sup> consultados así como las últimas revisiones epidemiológicas realizadas en la UCIP del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús entre 2005 y 2010<sup>8,135</sup>.

En la práctica totalidad de los pacientes analizados se aisló al VRS como la causa inicial del cuadro clínico de bronquiolitis. Como es sabido el VRS es la causa principal de bronquiolitis y se mantiene estable con el paso de los años<sup>133</sup>; de hecho, muchos estudios sobre bronquiolitis se centran solo en pacientes infectados por este virus (en un intento de homogenizar la muestra). En nuestro estudio, todos los pacientes menos dos (96%) estaban infectados por VRS, lo que permite equiparar los resultados obtenidos a aquellas muestras en las que uno de los criterios de selección era la positividad para el mencionado virus.

Este estudio ha encontrado que los pacientes más pequeños (menores de 6 semanas) eran los que acudían antes al hospital tras haber iniciado la clínica de bronquiolitis. Esto podría justificarse por la preocupación de los padres de tener un hijo enfermo de tan corta edad. Sin embargo, y pese a que la edad es un factor de riesgo para padecer una bronquiolitis grave, estos pacientes no presentaban las peores puntuaciones de gravedad según la escala de WD ni requirieron más días de ingreso en UCIP. Al analizar estos resultados en menores de 3 meses, se seguía observando que los pacientes acuden pronto al hospital pero en este caso padecían bronquiolitis más graves ya que requerían ingresos más prolongados en UCIP. Parece contradictorio que este grupo de pacientes con mayor edad pueda presentar cuadros más graves, pero

hay que tener en cuenta que muchos de los niños más pequeños ingresan en muchas ocasiones para una vigilancia estrecha ante la posibilidad de empeoramiento inmediato pese a que la gravedad del cuadro clínico en el momento del ingreso no sea tan importante (medida por una escala que no valora factores de riesgo, edad...). Como ya se ha mencionado anteriormente, la tasa de ingreso mayor se produce entre niños de 30 y 90 días de edad<sup>134</sup>, lo que podría justificarse por la pérdida de inmunidad adquirida por el paso transplacentario de inmunoglobulinas de la madre al niño.

Un tercio de nuestra muestra procedía del Servicio de Urgencias, mientras que el resto de ingresos correspondían a aquellos que empeoraron durante el ingreso en planta y requirieron ser atendidos en UCIP (desde el propio hospital de estudio o traslados desde otro hospital). Estos pacientes que ingresan directamente desde el Servicio de Urgencias no habían recibido ningún tratamiento para la bronquiolitis y por tanto la respuesta inmunológica a la infección en el momento del ingreso en UCIP no estaría modificada por estos tratamientos (antibióticos, corticoides, oxígeno...), a diferencia de la respuesta inmune de los pacientes que procedían de planta de hospitalización. Sin embargo, no se encontraron diferencias entre ambos grupos.

La escala de WD se emplea desde los años 70 para la valoración de la gravedad de la bronquiolitis<sup>126</sup>. Debido a la dificultad para su aplicación (dado que uno de los parámetros que evalúa es la  $paO_2$ ), muchos autores han modificado esta escala con el fin de hacerla más fácil de aplicar; en nuestro medio, la escala más utilizada es la modificada por Farrés. En nuestra serie, la mitad de los pacientes presentaba una bronquiolitis moderada y la otra mitad una bronquiolitis grave. Otro estudio sobre bronquiolitis realizado en la misma UCIP que el nuestro, pero desarrollado durante otro año epidémico, encontró la misma proporción de bronquiolitis graves y moderadas según esta escala<sup>135</sup>. Un gran número de pacientes que ingresa en UCIP por bronquiolitis lo hace atendiendo no tanto a la gravedad clínica sino a otras razones como la necesidad de mayores cuidados que en una planta de hospitalización o la susceptibilidad individual de complicaciones. Esto provoca que los pacientes con menor edad ingresen frecuentemente en UCIP pese a que la puntuación en estas escalas clínicas no sea la más alta posible. Sin embargo, la evolución

en UCIP de los pacientes con bronquiolitis moderada o grave medida por la escala de WD fue similar. Este hecho nos hace plantear lo complejo que resulta evaluar la gravedad de un cuadro de bronquiolitis así como la necesidad de nuevas escalas que predigan en el momento del ingreso una evolución más o menos favorable. Quizá en estas escalas habría que incluir variables inmunológicas individuales como las estudiadas en este trabajo y que, como se expondrá a continuación, se han asociado a mayor morbilidad.

Los datos básicos de laboratorio mostraron que los pacientes ingresados en UCIP por bronquiolitis presentaban datos analíticos habituales en el contexto de una infección viral (número absoluto de leucocitos normal con predominio de linfocitos y monocitos sin elevación de los reactantes de fase aguda) como afirman la mayoría de estudios<sup>26</sup>. Este hallazgo es consistente con que la mayoría de los pacientes de esta serie presentara una infección por VRS.

La tasa de sobreinfección bacteriana confirmada fue anecdótica. Como es sabido, la tasa de bacteriemias concomitantes en lactantes febriles con cuadros clínicos compatibles con viriasis es muy baja<sup>136</sup>. Este es el principal motivo por el que las guías clínicas actuales no recomiendan el empleo rutinario de antibióticos<sup>1,25</sup>. Sin embargo, la sobreinfección en pacientes con bronquiolitis es una complicación que resulta muy difícil de diagnosticar ya que en la mayoría de las ocasiones se trata de procesos sin expresión en los hemocultivos extraídos (resultan positivos en menos del 1%)<sup>137,138</sup>; además, la mayoría de los pacientes no se encuentran intubados, lo que hace imposible la recogida de un exudado bronquial. En este contexto de difícil manejo, el papel de los datos analíticos resulta importante a la hora de decidir qué pacientes deberían ser tratados con antibióticos. La mitad de los pacientes de este trabajo presentaba algún dato analítico clásico compatible con sobreinfección bacteriana, aunque en la mayoría de ellos no se obtuvo un cultivo positivo, lo que habla de la poca rentabilidad de este tipo de análisis, como ya ha sido publicado en algunos artículos<sup>139,140</sup>, y del sobreempleo de antibióticos en esta patología.

En cuanto al tratamiento respiratorio empleado, predomina la ventilación no invasiva sobre otras modalidades de asistencia. El empleo de este tipo de ventilación es una medida cada vez más frecuente a nivel mundial en el

tratamiento del paciente con bronquiolitis, convirtiéndose en uno de sus pilares terapéuticos. La reciente evolución hacia terapias respiratorias menos invasivas fue publicada hace unos años por nuestro grupo<sup>8</sup>. En este estudio la OAF fue el tipo de ventilación no invasiva más empleada, llegando casi al 50% de los pacientes. Este tipo de modalidad respiratoria es la opción preferida actualmente para la gran mayoría de la comunidad científica. De hecho, en muchos estudios se aboga por este sistema como soporte de inicio en pacientes con bronquiolitis, ya no solo en UCIP<sup>141,142</sup> sino también en planta de hospitalización<sup>143</sup>, siempre que el personal que los atienda esté formado en el empleo de esta modalidad de soporte respiratorio y los pacientes estén adecuadamente monitorizados.

La evolución de los pacientes con bronquiolitis grave suele ser favorable, con una bajísima tasa de éxitos. Los días de estancia en UCIP y de soporte respiratorio fueron similares a los publicados anteriormente, tanto por nuestro grupo como por otros centros; en la mayoría de los casos, los pacientes precisaron 5 días de ingreso en UCIP y al menos 3 de ellos con soporte respiratorio<sup>8,135</sup>.

## 2. Respuesta inflamatoria en pacientes con bronquiolitis

### 2.1 Respuesta inflamatoria

Como ya se ha comentado, la mayoría de los pacientes presentaban datos analíticos compatibles con infección viral. En los estudios consultados, la mayoría de los pacientes incluidos mostraban datos analíticos a favor de este tipo de infección. Además, como en nuestro caso, se obtuvo una prueba microbiológica viral positiva. Debido a esto, las guías clínicas actuales no recomiendan realizar estudios de laboratorio de rutina en estos pacientes<sup>1,18</sup>.

Al analizar la respuesta inflamatoria por grupos etarios se encontró que los pacientes de menor edad presentaban menor número de leucocitos totales así como de neutrófilos en sangre periférica. Este hallazgo concuerda con la literatura existente que afirma que los pacientes de menor edad presentan cierto grado de inmunosupresión relativa debido a la inmadurez del sistema inmune<sup>144</sup>, lo que conllevaría una menor expresión analítica. Sin embargo, los

reactantes de fase aguda no mostraron diferencias entre los grupos de edad, lo que los convierte en una herramienta útil en el diagnóstico diferencial de una posible sobreinfección bacteriana. Existen multitud de estudios que apoyan una mayor sensibilidad diagnóstica de los reactantes de fase aguda respecto a la elevación del número total de leucocitos<sup>145-147</sup>.

Por otro lado, se observó que los pacientes con bronquiolitis más graves (ya fueran debidas a una mayor duración del ingreso o a la obtención de una mayor puntuación en la escala de WD), eran aquellos que presentaban menor número de leucocitos totales en el momento del ingreso en sangre periférica, así como de linfocitos y monocitos. Estos resultados pueden justificarse debido a que los pacientes más pequeños fueron aquellos que requirieron más días de ingreso y, como se ha expuesto en el párrafo anterior, son los que presentan respuestas inmunológicas con menor expresión analítica. Actualmente no existe consenso en la comunidad científica sobre si una mayor carga viral en secreciones nasofaríngeas da lugar a cuadros más graves (al no haber sido controlada la infección por la respuesta inmune) o por el contrario menores cargas virales (debido a respuestas inmunes robustas) dan lugar a bronquiolitis más severas<sup>148-151</sup>. Este estudio no ha evaluado la carga viral, pero parece evidente que los pacientes con menor respuesta inmune fueron aquellos que requirieron más días de ingreso.

Los pacientes que habían presentado fiebre antes del ingreso eran de mayor edad. Es conocido que el sistema inmune es capaz de producir fiebre en respuesta a una infección a través de la expresión de ciertas citoquinas (sobre todo Interleuquina I, Factor de Necrosis Tumoral e Interferón  $\alpha$ )<sup>152</sup>. Este sistema de producción de fiebre no está desarrollado en los primeros meses de la vida, lo que explica que los pacientes de menor edad puedan no presentar fiebre ante infecciones graves<sup>153,154</sup>. Además, los pacientes con fiebre fueron aquellos con respuestas inmunes más desarrolladas, ya que presentaban mayor número de neutrófilos totales así como reactantes de fase aguda elevados.

Al analizar el empleo de corticoides como tratamiento previo al ingreso se esperaba encontrar alguna diferencia en cuanto al tipo de respuesta inmune o

al menos a la potencia de ésta. Los corticoides fueron empleados mayoritariamente en pacientes de mayor edad; esto puede ser debido al solapamiento de entidades clínicas entre bronquiolitis y asma del lactante, en la primera de ellas el empleo de corticoides está desaconsejado mientras que en la segunda puede tener un papel terapéutico<sup>155</sup>. Los corticoides son un potente inmunosupresor que podría influir en el devenir de la bronquiolitis, sin embargo no se observó que este tipo de medicación influyera en las variables evolutivas, como ha sido publicado con anterioridad<sup>35</sup>. Pese a que no se ha podido demostrar que influyan en las variables evolutivas, los pacientes que reciben corticoides en el contexto de bronquiolitis presentaban de forma muy clara menor número de monocitos totales. Estos hallazgos no han sido publicados con anterioridad, sin embargo, hay que analizarlos con cautela ya que, entre los resultados obtenidos, la edad de los pacientes también se correlacionó con el número de monocitos (a mayor edad, menor número de monocitos) y, por tanto, podría actuar como factor de confusión a la hora de analizar la relación entre los monocitos y el empleo de corticoides. Pese a la asociación encontrada entre ambas variables, el presente estudio no ha podido llegar a una conclusión sobre la implicación de este resultado. El resto de líneas celulares evaluadas no mostraron diferencias en los pacientes en los que se empleó corticoides.

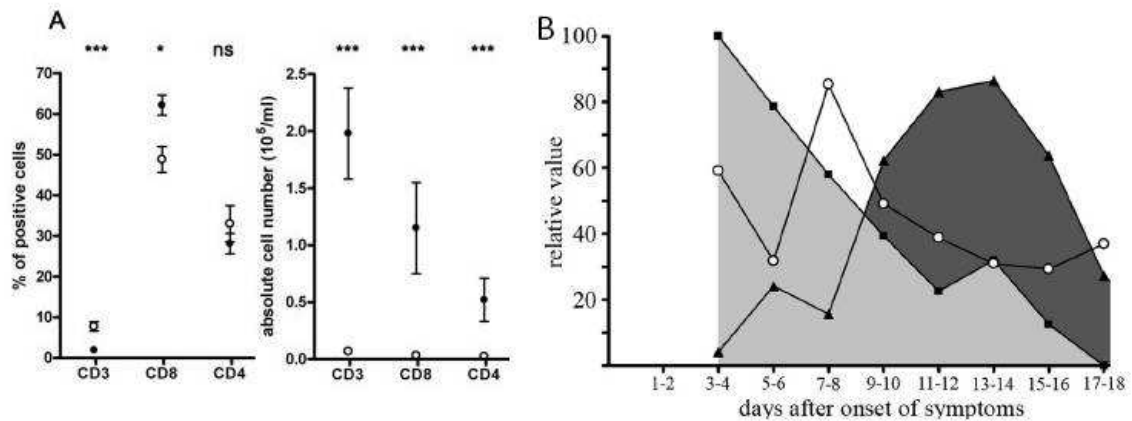
## 2.2 Subtipos de LT

Al analizar la subespecialización de linfocitos en linfocitos CD4 (*helper*) o CD8 (citotóxicos), se observó que la expresión génica de ambos receptores estaba polarizaba hacia CD8. Esto difiere de lo que se observa en individuos sanos en los que la proporción de LTh respecto a LTc es de 2:1. La mayoría de los pacientes del estudio expresaba en mayor medida el receptor CD8, característico de los LTc, alcanzando una proporción media de 1:3. Aunque esta característica pueda diferir a la de un individuo sano, no resulta extraño pensar que la respuesta citotóxica, necesaria para la defensa y aclaramiento de infecciones virales, esté aumentada en pacientes con bronquiolitis. Además, en 9 de cada 10 pacientes con bronquiolitis se encontró mayor expresión de CD8 que CD4.



Estos hallazgos respecto a la mayor expresión de CD8 en el contexto de bronquiolitis apoyan lo publicado hasta el momento. Heidema *et al.* publicaron en 2007 un estudio en el que observaron un mayor porcentaje de linfocitos CD8(+) que CD4(+) en lavados broncoalveolares de pacientes con infecciones por VRS respecto a controles sanos<sup>156</sup> en el momento de la intubación (media de 6 días de evolución clínica) (Figura 15). Este mismo grupo publicó en 2010 un estudio en el que observó un pico de activación de los LTc durante la convalecencia de una infección por VRS<sup>71</sup> (media de 10 días de evolución clínica) (Figura 15). En nuestro estudio hemos encontrado una clara activación de los LTc respecto a los LTh pero, a diferencia de los estudios mencionados, esta activación existe desde el momento del ingreso en UCIP (con una media de 3 días de evolución clínica). Las diferencias entre nuestro estudio y los mencionados con anterioridad pueden deberse al método empleado para analizar la expresión de CD8 y CD4 como marcadores de los LTc y LTh. En nuestro caso empleamos RTqPCR, lo que nos daría una visión de cuánto se expresa un gen en las células circulantes en sangre periférica, mientras que los otros estudios emplearon citometría de flujo, lo que permite conocer en números absolutos la cantidad de células presentes en un fluido o tejido corporal.

Analizando más profundamente la expresión de CD8 se observó que a mayor edad se expresaba más CD8, existiendo una correlación positiva entre la edad y el valor de expresión génica de este marcador. La edad es un factor fundamental en el desarrollo y madurez del sistema inmune, de hecho, es conocida la asociación entre las edades más tempranas de la vida y cierto grado de inmunosupresión<sup>157,158</sup>. La mayoría de los niños que padecen una bronquiolitis grave son de corta edad y por tanto con un sistema inmune más inmaduro que el de otro niño que ingresara por la misma patología pero con una edad más avanzada. Esto justificaría que los pacientes más pequeños presentaran menor expresión génica de CD8. Quedaría por dilucidar si esta menor expresión de CD8 condiciona cambios fisiopatológicos que conlleven una evolución clínica más o menos grave.



**Figura 15. A) Porcentaje y valor absoluto de LT CD8 y CD4 en muestras de lavado broncoalveolar en pacientes intubados en el contexto de una infección por VRS (círculos oscuros) y pacientes sanos (círculos vacíos), se observaron diferencias en ambos grupos (Adaptado de Heidema J, Lukens MV, van Maren WW, et al. *CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections. J Immunol* 2007;179:8410-7); B) Evolución de la carga viral (cuadrados), expresión de neutrófilos (círculos) y LT CD8 (triángulos) en sangre periférica durante una infección por VRS (Adaptado de Lukens MV, van de Pol AC, Coenjaerts FE, et al. *A systemic neutrophil response precedes robust CD8(+) T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants. J Virol* 2010;84:2374-83).**

Además de lo observado respecto al marcador CD8, los pacientes pequeños presentaron menor número de leucocitos totales en sangre periférica. Esto supone un dato más a favor de que los pacientes de menor edad presentan un mayor grado de inmunosupresión<sup>159</sup>.

También se observó que los pacientes con mayor expresión de CD8 eran aquellos en los que los reactantes de fase aguda estaban más elevados. Tradicionalmente se ha considerado que la elevación de reactantes de fase aguda (PCR y PCT en nuestro estudio) se debe a un estado de inflamación del paciente, ya sea de causa infecciosa o no<sup>160</sup>. La lectura de nuestros resultados podría realizarse en dos direcciones opuestas. Por un lado, debido a la mayor respuesta citotóxica durante una bronquiolitis, el paciente presenta mayor grado de inflamación pulmonar con el consecuente aumento de reactantes de fase aguda; pero también podría analizarse al revés, aquellos pacientes en los que existe mayor inflamación debido a la acción del virus son en los que se desencadena una mayor respuesta citotóxica. Independientemente de cuál sea

el desencadenante de una mayor expresión de CD8, parece clara su relación con la elevación de reactantes de fase aguda. La revisión de la literatura muestra diversos estudios en los que se ha demostrado una elevación de reactantes de fase aguda en pacientes con bronquiolitis<sup>161,162</sup>, lo que concuerda con nuestros resultados.

Al analizar en conjunto la expresión de CD4 y CD8 se observó una correlación positiva entre ambas poblaciones linfocitarias de tal forma que a medida que aumentaba una también aumentaba la otra. Este aumento de ambas poblaciones, con preferencia de los LTc sobre los LTh en pacientes con bronquiolitis, ya ha sido descrito con anterioridad<sup>156</sup>, pero, como se ha comentado, existe una tendencia a una mayor actividad de los LTc (caracterizada por la mayor expresión de CD8) que da lugar a un cociente entre ambas poblaciones de 1:3 a favor de los LTc.

Se objetivó que los pacientes con mayor expresión de CD4 eran aquellos que además presentaban leucocitosis en sangre periférica. Parece sensato que aquellos pacientes con mayor masa leucocitaria en sangre periférica presenten mayor expresión de CD4, lo que daría lugar a una mayor cantidad de LTh. Estos pacientes que, debido a la respuesta inmune para defenderse de una infección, han aumentado el número de leucocitos totales en sangre periférica, presumiblemente requieran una mayor cantidad de LTh para controlar esa respuesta inmunológica. La actividad de los LT CD4 y su subespecialización durante este tipo de infección están actualmente en estudio, ya que dependiendo de ésta pueden dar lugar a respuestas inmunológicas descontroladas<sup>72,163</sup>.

En definitiva, en pacientes con bronquiolitis existe una fuerte respuesta citotóxica caracterizada por una elevada expresión génica de CD8, lo que a la postre traduce un estado inflamatorio importante.

### 2.3 Subtipos de LT helper

Como se ha comentado en la introducción, al orquestar el tipo de respuesta inmune que se lleva a cabo durante una infección, los LTh desempeñan un rol fundamental. Dependiendo de las citoquinas que producen, se subdividen en diferentes linajes, que a su vez desempeñan papeles diferentes<sup>72</sup>. Las

respuestas coordinadas por los LTh1 son aquellas que se producen en infecciones intracelulares tales como las provocadas por virus.

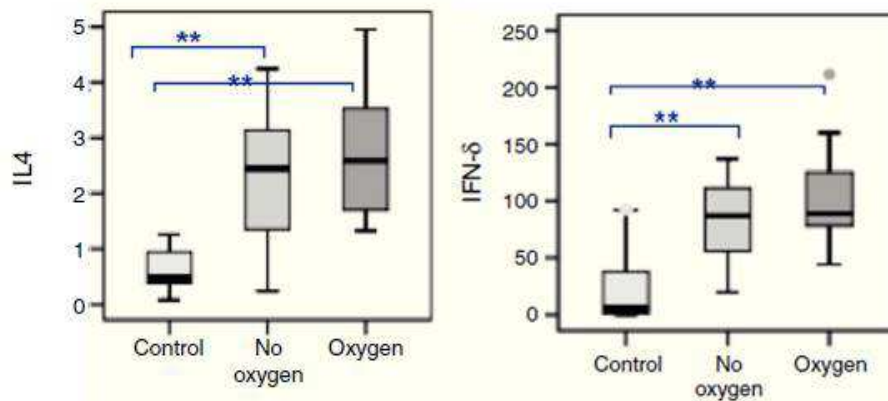
En este estudio se midió la expresión génica de INF $\gamma$  (marcador clásico de LTh1) y de IL-4 (marcador clásico de LTh2). En la práctica totalidad de los pacientes estudiados se encontró una expresión génica predominante de INF $\gamma$  respecto a IL-4, que alcanzó una proporción de 21:1. Estos resultados no resultan sorprendentes ya que se esperaba encontrar una respuesta inmunológica especializada contra infecciones intracelulares (como es el caso de los patógenos que provocan bronquiolitis) coordinada por LTh1.

Estos resultados apoyan la teoría de aquellos autores que promulgan una respuesta LTh1 en pacientes con bronquiolitis, ya sea en sangre periférica como en lavados nasofaríngeos<sup>164,165</sup>. Moreno-Solís *et al.* (Figura 16) hallaron un aumento de citoquinas específicas de LTh en lavados nasales aunque en este caso no hallaron esos resultados en sangre periférica. A diferencia del presente estudio en el que se ha medido la expresión génica, el estudio de Moreno-Solís solo evaluaba concentración de citoquina. Estos resultados podrían poner de manifiesto que durante la bronquiolitis las células inmunitarias se programan para realizar una función en sangre periférica pero no la llevan a cabo hasta que son reclutados a los órganos en los que se produce la infección.

Pese a que los resultados de este trabajo y los de otros autores apoyan respuestas LTh1<sup>166</sup> en pacientes con bronquiolitis, existe un debate abierto al respecto<sup>167</sup> ya que, en cambio, otras publicaciones han encontrado predominio de respuestas LTh2<sup>75,77,78</sup> o mixtas<sup>109,168</sup>. Las discrepancias entre los resultados obtenidos en estos estudios pueden deberse a las diferencias en la selección de pacientes o en el método elegido para evaluar el tipo de respuesta inmune.

Al analizar el tipo de respuesta se encontró que los pacientes con menor puntuación en la escala de WD eran aquellos que presentaban mayor expresión de IL-4 y por tanto una respuesta LTh menos polarizada hacia LTh1. Pese a que existen multitud de estudios sobre la implicación de las respuesta LTh2 en el desarrollo posterior de asma en pacientes que sufren una infección

por VRS, pocos han evaluado la gravedad de una bronquiolitis y su relación con la balance LTh1/LTh2 en el momento agudo de la infección<sup>165</sup>.



**Figura 16.** Cantidad de IL-4 e IFN $\gamma$  en lavados nasofaríngeos en pacientes con bronquiolitis respecto a un grupo control en el que podemos observar una mayor cantidad de ambas citoquinas en pacientes con bronquiolitis. El ratio IL-4/IFN $\gamma$  se mostraba más reducido en pacientes con bronquiolitis lo que traducía una predominancia de respuesta LTh1 ( $0.02 \pm 0.005$  vs.  $2.57 \pm 7.41$ ,  $p = 0.009$ ). Adaptado de *Moreno-Solis G, Torres-Borrego J, de la Torre-Aguilar MJ, Fernandez-Gutierrez F, Llorente-Cantarero FJ, Perez-Navero JL. Analysis of the local and systemic inflammatory response in hospitalized infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. Allergol Immunopathol (Madr) 2015;43:264-71.*

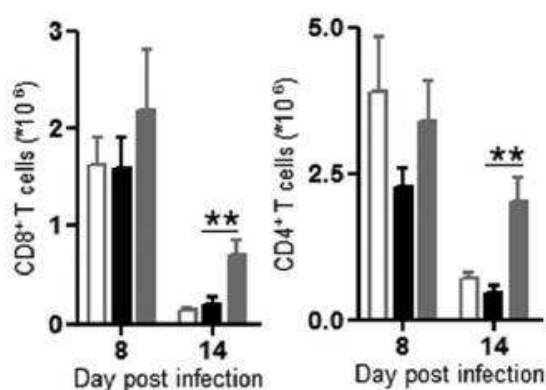
Esta relación puede deberse a que los pacientes que presentan menos polarización en la respuesta y, por tanto, un mayor balance entre LTh1/LTh2 (IFN $\gamma$ /IL-4) son aquellos en los que se ha producido una respuesta inmunológica menos exagerada. En estos pacientes con mayor expresión de IL-4 se encontró que también presentaban mayor expresión de CD4 pero no de CD8, lo que podría traducir que aquellos pacientes con un cociente IFN $\gamma$ /IL-4 balanceado organizan respuestas inmunológicas más controladas y por tanto con un balance LTc/LTh más igualitario.

Otro dato a favor de que el balance entre estos tipos de respuesta varíe según el curso clínico de la enfermedad se deriva de haber encontrado mayor expresión de IFN $\gamma$  en los pacientes con sobreinfección bacteriana. Como ya se ha comentado, los pacientes con estados inflamatorios más llamativos son aquellos que presentan mayor expresión de CD8 y de las citoquinas específicas de LTh1<sup>169</sup>.

Como ya se comentó en la introducción, un subtipo de LT *helper*, diferente a los clásicos LTh1 y LTh2, expresa FOXP3 y se conoce como LTreg. Fue

descubierto y clasificado como un grupo especial de leucocitos en 1995<sup>170</sup>, pero hasta 2003 no se descubrió el gen FOXP3<sup>80</sup> que les caracteriza. La función de este subgrupo de LT *helper* todavía está siendo estudiada, pero se sabe que estos linfocitos intervienen en el control de la respuesta inmune y la homeostasis leucocitaria<sup>72</sup>. Los resultados encontrados en el presente trabajo ponen de manifiesto que los pacientes con mayor expresión de FOXP3 eran los que más expresaban CD4 y CD8. Parece razonable que aquellos pacientes con respuestas inmunes más activas sean aquellos que necesiten de mayor feedback inmunológico y por tanto de más elementos de control, como los LTreg.

Existen pocos estudios que hayan investigado la relación de los LTreg en infecciones por VRS, y la mayoría de ellos se han realizado de forma experimental en animales. En un estudio con un modelo murino sobre infección por VRS y el papel de los LTreg encontró que aquellos ratones sin este tipo celular eran en los que se encontraba mayor proporción de linfocitos CD8(+) y CD4(+) en la vía respiratoria a los 14 días postinfección<sup>171</sup> (Figura 17). Estos resultados no coinciden con los hallados en nuestro trabajo. Sin embargo, traducen una interrelación entre los LTreg y su control de la respuesta inmune en la que seguramente influyan varios factores todavía por descubrir. El resto de estudios arroja resultados dispares que ponen de manifiesto lo poco que se conoce de este subtipo celular en este tipo de patología<sup>172,173</sup>.



**Figura 17.** Proporción de LT CD8 y CD4 muestras nasales de ratones depleccionados de LTreg (columna blanca), ratones *wild-type* infectados por VRS (columna negra) y ratones depleccionados de LTreg e infectados por VRS (columna gris). Adaptado de *Durant LR, Makris S, Voorburg CM, Loebbermann J, Johansson C, Openshaw PJ. Regulatory T cells prevent Th2 immune responses and pulmonary eosinophilia during respiratory syncytial virus infection in mice. J Virol 2013;87:10946-54.*

En resumen, el sistema inmune en pacientes con bronquiolitis grave responde a través de respuestas citotóxicas a expensas de linfocitos CD8 (LTc) y coordinada por LTh1 (productores de INF $\gamma$ ) y modulada por LTreg.

### 3. Quimioquinas

Las quimioquinas son un tipo de citoquinas que regulan el tráfico leucocitario (*trafficking*) a los órganos donde es requerida su función, por ejemplo al pulmón en el caso de la bronquiolitis<sup>86</sup>. El presente estudio evalúa las quimioquinas específicas de los LTh1 y LTh2 en un intento de conocer cuál de estas subpoblaciones linfocitarias estaba siendo atraída como parte de la respuesta inmune que se produce durante una bronquiolitis

Este estudio no cuenta con un grupo control, lo que hace difícil analizar el significado del valor absoluto de las quimioquinas en sangre periférica. En la actualidad existen pocos estudios sobre estas moléculas en pacientes con bronquiolitis, por lo que la comparación con la literatura existente resulta compleja y parcial, sin embargo, toda la producción científica al respecto remarca la importancia de este sistema de citoquinas en los pacientes con bronquiolitis<sup>13,110,111,115,174</sup>.

Las quimioquinas IP-10 y MIG son ligandos del receptor CXCR3, específico de LTh1, que desempeña un rol fundamental en el reclutamiento de estas células al pulmón en el contexto de infección viral<sup>175</sup>. Ambas quimioquinas mostraron correlaciones positivas con la expresión génica de INF $\gamma$  e IL-4. Estos resultados ponen de manifiesto la relación existente entre las quimioquinas y la respuesta inmune durante una bronquiolitis. Estos hallazgos son similares a los encontrados en otros estudios en los que se evaluaron estas moléculas en lavados nasales<sup>176</sup>. Respecto a IP-10, varios estudios realizados en niños con bronquiolitis demostraron que esta quimioquina se encontraba elevada respecto a controles sanos<sup>119,177</sup>, y además se relacionaba con el riesgo de hospitalización en estos pacientes<sup>176</sup>. Solo un estudio ha evaluado MIG y su relación con el VRS y, según los datos consultados, parece implicada en la aparición de sibilancias recurrentes tras un primer episodio de bronquiolitis<sup>178</sup>. En nuestro estudio, pese a que se puede intuir que ambas quimioquinas se



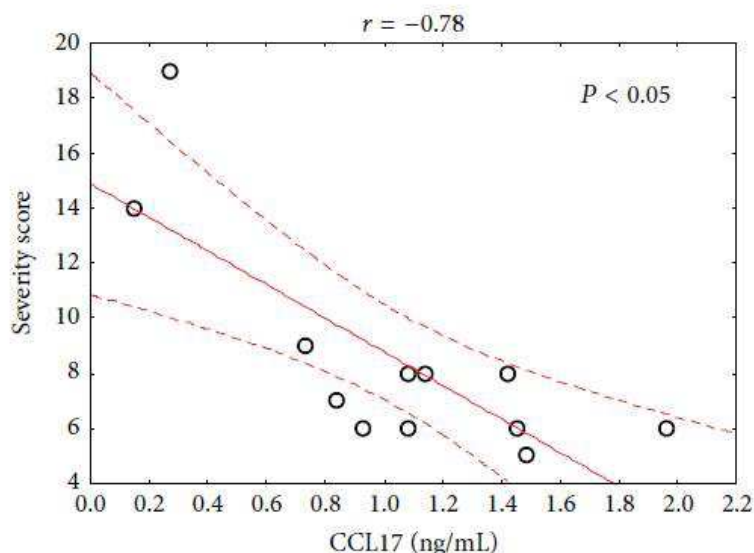
encuentran elevadas, no se encontró ninguna asociación con variables evolutivas analizadas.

Para evaluar la respuesta LTh2, se midió en plasma la cantidad de TARC y MDC, quimioquinas específicas del receptor CCR4 y por tanto de LTh2. A diferencia de las quimioquinas específicas de LTh1, TARC y MDC presentaban una correlación entre ellas, aunque no con su receptor específico. Estos resultados no han sido publicados hasta la fecha, de hecho solo existen tres artículos que evalúen el papel de TARC en bronquiolitis (uno de ellos en ratones)<sup>119,179,180</sup>. Respecto a MDC, dos estudios evaluaron, en contexto de bronquiolitis, la presencia de esta quimioquina en niños. El primero evaluaba la cantidad de MDC en sangre de cordón umbilical para relacionarla con la aparición de sibilancias en época de lactante<sup>181</sup>; sin embargo, esta quimioquina no fue cuantificada en el momento del episodio de bronquiolitis. El segundo estudio evaluaba la diferencia en el valor de esta quimioquina entre niños con bronquiolitis y controles sanos, pero los autores no fueron capaces de encontrar diferencias entre ambos grupos<sup>180</sup>.

De entre las variables analizadas, los valores bajos al ingreso de MDC y TARC predecían una duración prolongada de las necesidades de asistencia respiratoria (y de días de ingreso en UCIP en el caso de TARC). Este dato tampoco ha sido publicado en la literatura revisada, lo que podría convertir a estas quimioquinas en un dato objetivo de gravedad al ingreso en UCIP. Un estudio en 2014 encontró una relación entre los niveles de TARC y la gravedad de la bronquiolitis<sup>180</sup>, como se puede ver en la Figura 18, lo que apoya los hallazgos del presente estudio.

Parece contradictorio que valores altos de TARC y MDC se asocien a mejor evolución, ya que estas quimioquinas regulan el movimiento de los LTh2 a través del receptor CCR4. Este tipo de respuesta inmune resulta menos efectiva para el control de infecciones intracelulares, lo que podría dar lugar a una respuesta inmune atenuada. Este tipo de respuesta, al ser menos específica contra patógenos intracelulares, podría resultar a la postre protectora, dando lugar a una respuesta citotóxica amortiguada y no descontrolada en la que la propia respuesta inmune no causaría más daño.





**Figura 18.** Relación entre TARC (CCL17) y la gravedad de la bronquiolitis, podemos observar un correlación negativa. Adaptado de Vojvoda V, Savic Mlakar A, Jergovic M, et al. *The increased type-1 and type-2 chemokine levels in children with acute RSV infection alter the development of adaptive immune responses. Biomed Res Int 2014;2014:750521.*

#### 4. Receptores de Quimioquinas

Los receptores de quimioquinas son moléculas que se encuentran en la superficie de las células del sistema inmune y su unión con las quimioquinas desempeña un rol fundamental en el tráfico leucocitario hacia los órganos en los que existe inflamación. Los receptores de membrana CXCR3 y CCR4 son específicos para LTh1 y LTh2 respectivamente y por tanto pueden ser esenciales en el tipo de respuesta que se produce durante una bronquiolitis.

El presente estudio encontró una preferencia de expresión génica a favor de los LTh1, ya que se expresaba en mayoritariamente INF $\gamma$  respecto a IL-4. Sin embargo, al evaluar esta tendencia a través de los receptores de quimioquinas existía una expresión génica preferencial de CCR4 en una proporción de 2,5:1 respecto a CXCR3, lo que condicionaría una respuesta LTh2. Roe *et al.*<sup>119</sup> publicaron en 2011 un estudio en pacientes con bronquiolitis en el que la expresión de CXCR3 se encontraba disminuida respecto a controles sanos mientras que CCR4 no se alteraba, lo que daría lugar a un desequilibrio a favor de una respuesta LTh2, como ocurre en este estudio. Sin embargo, el estudio de Zou *et al.*<sup>177</sup> demostró justo lo contrario: el aumento de expresión del receptor CXCR3 en niños con bronquiolitis respecto a controles sanos, lo que

daría lugar a respuestas LTh1. Incluso hay estudios en los que se ha observado un aumento de ambos receptores<sup>180</sup>. Esta discrepancia de resultados pone de manifiesto el debate ya comentado sobre el tipo de respuesta LTh que se produce durante una bronquiolitis.

En nuestro estudio, la respuesta que ha predominado cuando el análisis se ha basado en receptores de quimioquinas ha sido LTh2; en cambio, cuando el análisis se ha basado en marcadores clásicos, la respuesta se ha organizado preferencialmente hacia LTh1. No existe en la literatura actual ningún estudio en el que, en función de la forma de medir el tipo de respuesta LTh, los resultados muestren un predominio de LTh1 o LTh2. No debe olvidarse que los receptores de quimioquinas son receptores inducibles tanto de forma positiva (aumentando su expresión en la membrana celular) como negativa (haciendo que estos receptores desaparezcan de la superficie de la célula) para de una forma u otra intervenir en el tráfico de leucocitos y su reclutamiento a zonas de infección; en otras palabras, el sistema de quimioquinas es dinámico. Teniendo esta idea presente, los resultados obtenidos podrían poner de manifiesto una población linfocitaria especializada en respuestas LTh1 (dada la mayor expresión de INF $\gamma$ ) a la espera de ser reclutadas al pulmón (debido a que no hay una fuerte expresión de CXCR3 que acompañe a los niveles de INF $\gamma$ ). Esta disparidad entre la expresión de dichos genes puede suponer además un sistema de regulación de la respuesta inmune, evitando excesos inflamatorios que podrían ser dañinos para el paciente.

Respecto a la relación de los receptores de quimioquinas con variables epidemiológicas y clínicas, cabe destacar que aquellos pacientes que acudían pronto al hospital presentaban mayor expresión de CCR4. El hecho aislado de que CCR4 fuera mayor en estos pacientes podría condicionar un mayor reclutamiento al pulmón de LTh2, lo que daría lugar a respuestas poco efectivas frente a patógenos intracelulares. Esto podría provocar cuadros respiratorios más graves que requerirían atención de forma más temprana. Además, los pacientes con bronquiolitis más graves medidas por la escala de WD presentaban mayor expresión de CCR4. No existen estudios en la literatura analizada que hayan evaluado la gravedad de un cuadro clínico de bronquiolitis y su relación con estos receptores de quimioquinas. Sin embargo,

el estudio antes mencionado que evaluaba TARC (específica para CCR4) encontró una relación inversa entre esta quimioquina y la gravedad de bronquiolitis<sup>180</sup>; esto contradice el hallazgo de que CCR4 y la gravedad de la bronquiolitis se correlacionen de forma positiva. Creemos que es probable que TARC y CCR4, pese a ser específicos el uno del otro, no se relacionen de forma directa o que existan más factores implicados.

Se encontró relación entre CXCR3 y los pacientes que presentaban fiebre o elevación de marcadores inflamatorios clásicos (mayor número de leucocitos y elevación mayor de reactantes de fase aguda). Además, los pacientes con elevación de reactantes de fase aguda presentaban mayor expresión de CD8. Por tanto, parece sensato que respuestas citotóxicas importantes precisen de mayor control a cargo de los LTh1.

# LIMITACIONES

---

Este estudio presenta algunas limitaciones claras que deben mencionarse.

Como ya se ha comentado en la discusión, la muestra de pacientes carece de un grupo control. Debido a esta carencia el análisis del valor absoluto de los valores analizados resulta complejo y en cualquier caso parcial. Es cierto que se han encontrado asociaciones entre el valor de algunas quimioquinas o de marcadores de expresión génica y las variables clínicas; sin embargo, no se puede afirmar que tal o cual valor de alguna de ellas sea alto o bajo en el momento del ingreso en UCIP. Resultaría muy interesante poder encontrar un grupo control con el que comparar esta muestra: por un lado, se compararía con niños sanos y, por otro, con niños con bronquiolitis aguda leve (que no requirieran ingreso en el hospital) o no tan grave como para precisar un ingreso en UCIP (niños con bronquiolitis ingresados en planta). Pese a todo, carecer de grupo control no supone un sesgo en la interpretación de resultados del estudio.

La obtención de sangre periférica para el estudio se llevó a cabo por el enfermero encargado del paciente. Pese a la alta homogeneidad en la forma de trabajar del personal de enfermería de la UCIP, esto podría haber introducido un sesgo en el estudio debido a las diferentes formas de recolección. Sin embargo, el procesamiento de las muestras una vez extraídas se llevó a cabo por la misma persona siguiendo siempre el mismo protocolo.

Acotar la recogida de muestras a las primeras 24 horas de ingreso introduce otro sesgo en el estudio debido a las diferencias en el momento de recoger las muestras. La mayoría de los estudios mencionados en la bibliografía cuentan con este sesgo, pues la recogida de muestras la realizan durante un periodo de tiempo que puede ser variable y no exactamente en el mismo momento en cada paciente. Hay que tener en cuenta que en 24 horas la respuesta inmunológica puede cambiar y por tanto sesgar la interpretación de resultados. Sin embargo, es muy complicado no caer en este sesgo al realizar un estudio similar al del presente trabajo en el que los pacientes ingresan en cualquier momento del día

y en muchas ocasiones los pediatras encargados del estudio no están presentes.

Por último, merece la pena mencionar el tipo de muestras en las que se analizaron los diferentes marcadores estudiados. Como es sabido, las quimioquinas y sus receptores son fundamentales en la migración de leucocitos a los tejidos donde son necesarios; en el caso de un cuadro de bronquiolitis aguda, la migración se produce al pulmón y a la vía respiratoria.

El presente estudio solo analiza marcadores en sangre periférica, sin embargo, hay que tener en cuenta que las quimioquinas se segregan de manera local y por tanto su valor y relación entre ellas puede presentar variaciones en las muestras locales (tales como lavados nasofaríngeos o broncoalveolares o biopsias pulmonares) y en las muestras de sangre periférica. Más aún, la expresión génica de marcadores linfocitarios clásicos podría ser diferente en ambos tipos de muestras. Además, la proporción de células encontradas en sangre periférica puede variar respecto a la proporción hallada en la vía aérea. Entre las técnicas mencionadas, solo el lavado nasal es accesible a la práctica habitual dada la invasividad de los otros dos métodos y, además, se ha demostrado que existe una correlación en los resultados entre ambas tipos de muestras<sup>182</sup>.

Por tanto, en nuestro estudio, los resultados de los marcadores realizados debe analizarse con cautela debido a que solo evalúa un lado de la ecuación.

La mayoría de los estudios mencionados a lo largo del texto analiza alguno de los marcadores de este estudio o en sangre periférica o en muestras obtenidas de lavados nasales o de lavados broncoalveolares de niños intubados. Son muy escasos los estudios en los que dicho análisis se ha realizado en paralelo para conocer tanto la respuesta local como la sistémica.

El estudio comentado anteriormente de Moreno-Solis *et al*<sup>164</sup>. es uno de los pocos estudios en los que se evaluó la proporción de algunos de estos marcadores en ambos tipos de muestras en pacientes con bronquiolitis. Estos autores solo encontraron diferencias significativas entre el grupo estudio y el grupo control en las muestras obtenidas mediante lavado nasal, mientras que

las mediciones en sangre periférica no mostraron diferencias. Al estudiar las correlaciones de los valores de quimioquinas entre ambos tipos de muestras solo algunas de ellas mostraban correlaciones estadísticamente significativas, pero lo que resulta más llamativo es que las éstas (MIP-1 $\alpha$  y MIP1 $\beta$ , ligandos no específicos de CCR5, característico de LTh1 entre otros tipos de células) presentaban correlaciones negativas entre los valores obtenidos en sangre periférica y lavados nasales, de tal forma que a medida que aumentaba en un tipo de muestra disminuía en la otra y viceversa.

Estos resultados ponen de manifiesto la complejidad de análisis de este sistema de citoquinas así como la cautela con la que deben analizarse los resultados que evalúen solo uno de los dos tipos de muestras: es probable que los resultados obtenidos en uno de los compartimentos no se puedan equiparar de forma paralela en el otro.

# LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN FUTURAS

---

De las limitaciones de este estudio se desprenden posibles líneas de investigación que darían lugar a nuevos estudios.

Conseguir un grupo control tanto de niños sanos como de niños con bronquiolitis no tan grave como para requerir ingreso en UCIP debería ser uno de los primeros pasos a seguir. De esta forma se podría conocer si el estado inmunológico detectado en los pacientes con bronquiolitis que requieren UCIP varía respecto a los controles. Este hecho daría pie a nuevas hipótesis sobre si el control de la respuesta inmunológica podría dar lugar a cuadros de bronquiolitis no tan graves. No olvidemos que las quimioquinas son un tipo de citoquinas que dan lugar a migración de leucocitos y, por ello, tanto la estimulación como inhibición de estas moléculas podría dar lugar a un tipo de respuesta inmunológica ventajosa para combatir este tipo de infección.

Este estudio evalúa solamente la respuesta inmunológica en sangre periférica. Comparar esta respuesta con el modo en que reacciona el sistema inmune allí donde se está produciendo la inflamación aportaría más luz sobre cómo actúa el organismo para defenderse de este tipo de infecciones. Por tanto, es primordial realizar un estudio pareado de respuesta inmune en bronquiolitis tanto en sangre periférica como en muestras obtenidas de lavados nasales (o broncoalveolares, aunque ésto parece mucho más complicado).

Por último, los resultados expuestos en este estudio arrojan luz sobre el tipo de respuesta inmune en la bronquiolitis; no obstante, solo se ha evaluado parte de la respuesta inmune durante una bronquiolitis. Por ello, el desarrollo de estudios que evalúen de forma completa la respuesta inmunológica serían ideales pese a la dificultad técnica que supone evaluar en cada paciente cómo se comporta dicho sistema.

# CONCLUSIONES

---

1. Durante una bronquiolitis aguda grave se produce una activación inmunológica específica contra gérmenes intracelulares caracterizada por una intensa respuesta a cargo de los LTc y un balance de LTh preferente hacia LTh1.
2. Los niños con mayor masa leucocitaria durante una bronquiolitis aguda requieren de una mayor actividad de los LTh para la homeostasis inmunitaria.
3. El tipo de respuesta preferencial de los LTh durante una bronquiolitis aguda es de tipo LTh1, caracterizada por una mayor expresión en sangre periférica de INF $\gamma$  que de IL-4. Además, el INF $\gamma$  está relacionado con la posibilidad de una sobreinfección bacteriana.
4. No existe una relación cuantitativa directa en sangre periférica entre las quimioquinas IP-10, MDC, TARC y MIG y sus receptores (CXCR3 y CCR4) en pacientes con bronquiolitis aguda grave, lo que traduce una relación cualitativa compleja entre ellos.
5. El estudio en sangre periférica de los receptores de quimioquinas específicos de LTh1 y LTh2 en pacientes con bronquiolitis aguda grave revela un tipo de respuesta inmunológica preferente hacia LTh2, lo que supone una discrepancia con los resultados obtenidos a través del estudio de marcadores clásicos para LTh.
6. El valor de las quimioquinas TARC y MDC al ingreso se relaciona con el pronóstico de los pacientes con bronquiolitis aguda grave al presentar una relación con la duración del ingreso en UCIP y las necesidades de soporte respiratorio.



# ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICOS

---

## 1. Figuras

**Figura 1.** Representación gráfica de sucesivas epidemias de bronquiolitis y su asociación con el VRS.

**Figura 2.** Distribución de la epidemia de bronquiolitis en Estados Unidos a lo largo de un año.

**Figura 3.** Visión microscópica del bronquiolo en cuadro de bronquiolitis aguda.

**Figura 4.** Representación grafica de los cambios macroscópicos en la bronquiolitis aguda.

**Figura 5.** Representación de los diferentes tipos de linfocitos CD4 (LTh) y las citoquinas que producen.

**Figura 6.** Cociente IL4/IFN $\gamma$  en pacientes con catarros de vías altas y con bronquiolitis aguda.

**Figura 7.** Diapédesis leucocitaria y la participación de las quimioquinas en este proceso.

**Figura 8.** La familia de las quimioquinas. Diferentes tipos, familias y receptores.

**Figura 9.** Ejemplos de diferentes enfermedades y su relación con quimioquinas.

**Figura 10.** Estudio de quimioquinas en sangre periférica en pacientes ingresados por bronquiolitis.

**Figura 11.** Estudio de quimioquinas en lavado broncoalveolar en pacientes infectados con VRS respecto a controles sanos.

**Figura 12.** Estudio sobre las quimioquinas IP-10 y TARC en pacientes en fase aguda o convalecencia de una infección por el VRS respecto controles sanos.

**Figura 13.** Estudio que evalúa la especificada de diferentes receptores de quimioquinas (CKR) en LTh1 y LTh2.

**Figura 14.** Análisis de mRNA mediante *Northern blot* para el estudio de LTh1 y LTh2.

**Figura 15.** A) Porcentaje y valor absoluto de LT CD8 y CD4 en muestras de lavado broncoalveolar en pacientes intubados en el contexto de una infección por VRS; B) Evolución de la carga viral, expresión de neutrófilos y LT CD8 (triángulos) en sangre periférica durante una infección por VRS.

**Figura 16.** Cantidad de IL-4 e INF $\gamma$  en lavados nasofaríngeos en pacientes con bronquiolitis respecto a un grupo control.

**Figura 17.** Proporción de LT CD8 y CD4 muestras nasales de ratones depleccionados de LTreg, ratones *wild-type* infectados por VRS y ratones depleccionados de LTreg e infectados por VRS.

**Figura 18.** Relación entre TARC (CCL17) y la gravedad de la bronquiolitis.

## 2. Tablas

**Tabla I.** Diferencias entre LTh1 y LTh2 respecto a las citoquinas que producen, receptores de membrana específicos y quimioquinas que los estimulan.

## 3. Gráficos

**Gráfico 1.** Antecedentes personales de los pacientes incluidos en el estudio

**Gráfico 2.** Recuento de pacientes según gravedad de escala de Wood-Downes

**Gráfico 3.** Porcentaje de pacientes con sobreinfección bacteriana según tipo

**Gráfico 4.** Tipo de soporte respiratorio máximo durante el ingreso en UCIP

**Gráfico 5.** Diferencias entre los pacientes mayores y menores de 3 meses en función de los días de ingreso y las horas de soporte respiratorio

**Gráfico 6.** Diferencias de expresión en CCR4 y el ratio CXCR3/CCR4 en los pacientes que según la premura en la atención en el hospital.

**Gráfico 7.** Diferencias en CCR4 y en el ratio CXCR3/CCR4 en pacientes con bronquiolitis moderada o grave según WD.

**Gráfico 8.** Días de ingreso UCIP y escala de WD al ingreso en UCIP según el soporte respiratorio máximo empleado durante el ingreso.

**Gráfico 9.** Valor mediano de MDC en aquellos pacientes que precisaban menos horas de soporte respiratorio que el valor mediano y los que precisaban más horas

**Gráfico 10.** Valor mediano de CCR4 en aquellos pacientes en los que se había empleado corticoides antes del ingreso.

**Gráfico 11.** Valores de MIG y de expresión de CD4 en según la presencia de leucocitosis.

**Gráfico 12.** Valores de CD8 y CCR4 según el valor de PCR.

**Gráfico 13.** Valor del ratio CXCR3/CCR4 según el valor de PCR.

**Gráfico 14.** Diferencias en MDC según el valor alto o bajo de PCT

**Gráfico 15.** Valor de IFN $\gamma$  según los datos de sobreinfección bacteriana.

**Gráfico 16.** Valor de CD8 y FOXP3 en pacientes con valores de expresión de CD4 mayores y menores que el valor mediano.

**Gráfico 17.** Días de ingreso y número total de leucocitos en sangre periférica en aquellos pacientes que presentaba valores de CD8 por encima del valor mediano.

**Gráfico 18.** Valor de CD4 y FOXP3 en pacientes que presentaba valores de CD8 por encima del valor mediano

**Gráfico 19.** Valor de escala de WD en los pacientes con valores de IL-4 por encima del valor mediano.

**Gráfico 20.** Diferencia en CD4 e FOXP3 en los pacientes con valores de IL-4 por encima del valor mediano.

**Gráfico 21.** Diferencia en CD4 y CD8 en los pacientes con valores de FOXP3 por encima del valor mediano.

**Gráfico 22.** Valor de leucocitos y neutrófilos totales en pacientes con MIG por encima del valor mediano.

**Gráfico 24.** Horas de soporte respiratorio y días de ingreso en pacientes con TARC por encima del valor mediano.

**Gráfico 23.** Diferencia en CD8 en pacientes con MIG por encima del valor mediano.

**Gráfico 25.** Valor de MDC en pacientes con TARC por encima del valor mediano.

**Gráfico 26.** Valor de MIG y CXCR3 en pacientes con valor de MDC por encima del valor mediano.

**Gráfico 27.** Valores de CCR4 y ratio CXCR3 en pacientes con valor de CXCR3 por encima del valor mediano.

**Gráfico 28.** Correlación entre la edad y los valores de expresión de CD8.

**Gráfico 29.** Correlación entre los días de ingreso con las horas de soporte respiratorio.

**Gráfico 30.** Correlación entre TARC con los días de ingreso y las horas de soporte respiratorio

**Gráfico 31.** Correlación entre el número total de linfocitos en sangre periférica y los días de evolución de la clínica.

**Gráfico 32.** Correlación entre la escala de WD y los linfocitos y monocitos en sangre periférica.

**Gráfico 33.** Correlación entre leucocitos con neutrófilos y linfocitos totales en sangre periférica

**Gráfico 34.** Correlación entre los leucocitos totales en sangre periférica y la expresión génica de CD4

**Gráfico 35.** Correlación entre leucocitos y neutrófilos en sangre periférica y MIG

**Gráfico 36.** Correlación entre monocitos en sangre periférica y los niveles de expresión génica de IFN $\gamma$

**Gráfico 37.** Correlación entre PCR y CD8 y PCT y CXCR3

**Gráfico 38.** Correlaciones de FOXP3 con los diferentes marcadores linfocitarios (CD4, CD8, IFN $\gamma$  e IL-4)

**Gráfico 39.** Representación de las correlaciones significativas entre las quimioquinas y sus receptores

# BIBLIOGRAFÍA

---

1. Ralston SL, Lieberthal AS, Meissner HC, et al. Clinical practice guideline: the diagnosis, management, and prevention of bronchiolitis. *Pediatrics* 2014;134:e1474-502.
2. Gonzalez de Dios J, Ochoa Sangrador C. [Consensus conference on acute bronchiolitis (I): methodology and recommendations]. *An Pediatr (Barc)* 2010;72:221 e1- e33.
3. McConnochie KM. Bronchiolitis. What's in the name? *Am J Dis Child* 1983;137:11-3.
4. Winter ST. Bronchiolitis--what's in a name? *Clin Pediatr (Phila)* 1971;10:485-6.
5. Zorc JJ, Hall CB. Bronchiolitis: recent evidence on diagnosis and management. *Pediatrics* 2010;125:342-9.
6. Gonzalez de Dios J, Ochoa Sangrador C. [Study of variability in the management of acute bronchiolitis in Spain in relation to age of patients. National multicenter study (aBREVIADo project)]. *An Pediatr (Barc)* 2010;72:4-18.
7. Ochoa Sangrador C, Gonzalez de Dios J. [Consensus conference on acute bronchiolitis (II): epidemiology of acute bronchiolitis. Review of the scientific evidence]. *An Pediatr (Barc)* 2010;72:222 e1- e26.
8. Oñoro G, Perez Suarez E, Iglesias Bouzas MI, et al. [Severe bronchiolitis. Changes in epidemiology and respiratory support]. *An Pediatr (Barc)* 2011;74:371-6.
9. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med* 2009;360:588-98.
10. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet* 2010;375:1545-55.
11. Kumar M. Childhood mortality due to respiratory syncytial virus. *Lancet* 2010;376:872; author reply -3.
12. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med* 2001;344:1917-28.
13. Meissner HC. Viral Bronchiolitis in Children. *N Engl J Med* 2016;374:62-72.
14. Mulet JF, Rodriguez de Torres BO. [Viral induced bronchiolitis and genetics]. *An Pediatr (Barc)* 2010;73:159-61.

15. Thomsen SF, Stensballe LG, Skytthe A, Kyvik KO, Backer V, Bisgaard H. Increased concordance of severe respiratory syncytial virus infection in identical twins. *Pediatrics* 2008;121:493-6.
16. Janssen R, Bont L, Siezen CL, et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J Infect Dis* 2007;196:826-34.
17. Ricart S, Marcos MA, Sarda M, et al. Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. *Pediatr Pulmonol* 2013;48:456-63.
18. Ochoa Sangrador C, Gonzalez de Dios J. [Diagnosis in acute bronchiolitis. Review of the evidence for the consensus conference on acute bronchiolitis]. *An Pediatr (Barc)* 2010;72:284 e1- e23.
19. Aherne W, Bird T, Court SD, Gardner PS, McQuillin J. Pathological changes in virus infections of the lower respiratory tract in children. *J Clin Pathol* 1970;23:7-18.
20. Engel, Newns GH. Proliferative Mural Bronchiolitis. *Arch Dis Child* 1940;15:219-29.
21. Castro-Rodriguez JA, Rodriguez-Martinez CE, Sossa-Briceno MP. Principal findings of systematic reviews for the management of acute bronchiolitis in children. *Paediatr Respir Rev* 2015;16:267-75.
22. Shay DK, Holman RC, Roosevelt GE, Clarke MJ, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997. *J Infect Dis* 2001;183:16-22.
23. Thorburn K. Pre-existing disease is associated with a significantly higher risk of death in severe respiratory syncytial virus infection. *Arch Dis Child* 2009;94:99-103.
24. Ricci V, Delgado Nunes V, Murphy MS, Cunningham S. Bronchiolitis in children: summary of NICE guidance. *BMJ* 2015;350:h2305.
25. Gonzalez de Dios J, Ochoa Sangrador C. [Consensus conference on acute bronchiolitis (IV): Treatment of acute bronchiolitis. Review of scientific evidence]. *An Pediatr (Barc)* 2010;72:285 e1- e42.
26. Subcommittee on Diagnosis and Management of Bronchiolitis (American Academy of Family Physicians tACoCP, and the American Thoracic Society). Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics* 2006;118:1774-93.
27. David M, Luc-Vanuxem C, Loundou A, Bosdure E, Auquier P, Dubus JC. [Assessment of the French Consensus Conference for Acute Viral Bronchiolitis on outpatient management: progress between 2003 and 2008]. *Arch Pediatr* 2010;17:125-31.

28. Gadomski AM, Scribani MB. Bronchodilators for bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;CD001266.
29. Chavasse R, Seddon P, Bara A, McKean M. Short acting beta agonists for recurrent wheeze in children under 2 years of age. *Cochrane Database Syst Rev* 2002;CD002873.
30. Skjerven HO, Hunderi JO, Brugmann-Pieper SK, et al. Racemic adrenaline and inhalation strategies in acute bronchiolitis. *N Engl J Med* 2013;368:2286-93.
31. Schuh S, Johnson D, Canny G, et al. Efficacy of adding nebulized ipratropium bromide to nebulized albuterol therapy in acute bronchiolitis. *Pediatrics* 1992;90:920-3.
32. Corneli HM, Zorc JJ, Mahajan P, et al. A multicenter, randomized, controlled trial of dexamethasone for bronchiolitis. *N Engl J Med* 2007;357:331-9.
33. Garrison MM, Christakis DA, Harvey E, Cummings P, Davis RL. Systemic corticosteroids in infant bronchiolitis: A meta-analysis. *Pediatrics* 2000;105:E44.
34. Fernandes RM, Hartling L. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. *JAMA* 2014;311:87-8.
35. Fernandes RM, Bialy LM, Vandermeer B, et al. Glucocorticoids for acute viral bronchiolitis in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;CD004878.
36. Sarrell EM, Tal G, Witzling M, et al. Nebulized 3% hypertonic saline solution treatment in ambulatory children with viral bronchiolitis decreases symptoms. *Chest* 2002;122:2015-20.
37. Mandelberg A, Amirav I. Hypertonic saline or high volume normal saline for viral bronchiolitis: mechanisms and rationale. *Pediatr Pulmonol* 2010;45:36-40.
38. Florin TA, Shaw KN, Kittick M, Yakscoe S, Zorc JJ. Nebulized hypertonic saline for bronchiolitis in the emergency department: a randomized clinical trial. *JAMA Pediatr* 2014;168:664-70.
39. Luo Z, Liu E, Luo J, et al. Nebulized hypertonic saline/salbutamol solution treatment in hospitalized children with mild to moderate bronchiolitis. *Pediatr Int* 2010;52:199-202.
40. Zhang L, Mendoza-Sassi RA, Klassen TP, Wainwright C. Nebulized Hypertonic Saline for Acute Bronchiolitis: A Systematic Review. *Pediatrics* 2015;136:687-701.
41. Chen YJ, Lee WL, Wang CM, Chou HH. Nebulized hypertonic saline treatment reduces both rate and duration of hospitalization for acute



- bronchiolitis in infants: an updated meta-analysis. *Pediatr Neonatol* 2014;55:431-8.
42. Ventre K, Randolph A. WITHDRAWN: Ribavirin for respiratory syncytial virus infection of the lower respiratory tract in infants and young children. *Cochrane Database Syst Rev* 2010:CD000181.
  43. Fuller H, Del Mar C. Immunoglobulin treatment for respiratory syncytial virus infection. *Cochrane Database Syst Rev* 2006:CD004883.
  44. Friis B, Andersen P, Brenoe E, et al. Antibiotic treatment of pneumonia and bronchiolitis. A prospective randomised study. *Arch Dis Child* 1984;59:1038-45.
  45. Cunningham S, McMurray A. Observational study of two oxygen saturation targets for discharge in bronchiolitis. *Arch Dis Child* 2012;97:361-3.
  46. Nebot MS, Teruel GC, Cubells CL, Sabadell MD, Fernandez JP. [Acute bronchiolitis clinical practice guideline: recommendations for clinical practice]. *An Pediatr (Barc)* 2010;73:208 e1-10.
  47. Greenough A. Role of ventilation in RSV disease: CPAP, ventilation, HFO, ECMO. *Paediatr Respir Rev* 2009;10 Suppl 1:26-8.
  48. Flamant C, Hallalel F, Nolent P, Chevalier JY, Renolleau S. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in children: from short mechanical ventilation to extracorporeal membrane oxygenation. *Eur J Pediatr* 2005;164:93-8.
  49. Davison C, Ventre KM, Luchetti M, Randolph AG. Efficacy of interventions for bronchiolitis in critically ill infants: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Crit Care Med* 2004;5:482-9.
  50. Patel NR, Hammer J, Nichani S, Numa A, Newth CJ. Effect of inhaled nitric oxide on respiratory mechanics in ventilated infants with RSV bronchiolitis. *Intensive Care Med* 1999;25:81-7.
  51. Cambonie G, Milesi C, Fournier-Favre S, et al. Clinical effects of heliox administration for acute bronchiolitis in young infants. *Chest* 2006;129:676-82.
  52. Gajdos V, Katsahian S, Beydon N, et al. Effectiveness of chest physiotherapy in infants hospitalized with acute bronchiolitis: a multicenter, randomized, controlled trial. *PLoS Med* 2010;7:e1000345.
  53. Rochat I, Leis P, Bouchardy M, et al. Chest physiotherapy using passive expiratory techniques does not reduce bronchiolitis severity: a randomised controlled trial. *Eur J Pediatr* 2012;171:457-62.
  54. Bont L, Kimpen JL. Immunological mechanisms of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Intensive Care Med* 2002;28:616-21.

55. Bhan C, Dipankar P, Chakraborty P, Sarangi PP. Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis. *Inflamm Res* 2016.
56. Azizia M, Lloyd J, Allen M, Klein N, Peebles D. Immune status in very preterm neonates. *Pediatrics* 2012;129:e967-74.
57. Hoffman SJ, Laham FR, Polack FP. Mechanisms of illness during respiratory syncytial virus infection: the lungs, the virus and the immune response. *Microbes Infect* 2004;6:767-72.
58. Zhang P, Summer WR, Bagby GJ, Nelson S. Innate immunity and pulmonary host defense. *Immunol Rev* 2000;173:39-51.
59. Smyth RL. Innate immunity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Exp Lung Res* 2007;33:543-7.
60. Valarcher JF, Furze J, Wyld S, Cook R, Conzelmann KK, Taylor G. Role of alpha/beta interferons in the attenuation and immunogenicity of recombinant bovine respiratory syncytial viruses lacking NS proteins. *J Virol* 2003;77:8426-39.
61. Ruuskanen O, Ogra PL. Respiratory syncytial virus. *Curr Probl Pediatr* 1993;23:50-79.
62. De Weerd W, Twilhaar WN, Kimpen JL. T cell subset analysis in peripheral blood of children with RSV bronchiolitis. *Scand J Infect Dis* 1998;30:77-80.
63. Ogra PL. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. *Paediatr Respir Rev* 2004;5 Suppl A:S119-26.
64. Welliver RC, Kaul TN, Putnam TI, Sun M, Riddlesberger K, Ogra PL. The antibody response to primary and secondary infection with respiratory syncytial virus: kinetics of class-specific responses. *J Pediatr* 1980;96:808-13.
65. Meurman O, Ruuskanen O, Sarkkinen H, Hanninen P, Halonen P. Immunoglobulin class-specific antibody response in respiratory syncytial virus infection measured by enzyme immunoassay. *J Med Virol* 1984;14:67-72.
66. The IMPact-RSV Study Group. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. *Pediatrics* 1998;102:531-7.
67. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46.
68. Laidlaw BJ, Craft JE, Kaech SM. The multifaceted role of CD4(+) T cells in CD8(+) T cell memory. *Nat Rev Immunol* 2016;16:102-11.

69. Byeon JH, Lee JC, Choi IS, Yoo Y, Park SH, Choung JT. Comparison of cytokine responses in nasopharyngeal aspirates from children with viral lower respiratory tract infections. *Acta Paediatr* 2009;98:725-30.
70. Jiang XB, Wang ZD, Zhu Y, et al. Inhibition of CD8+ T lymphocytes attenuates respiratory syncytial virus-enhanced allergic inflammation. *Respiration* 2009;77:76-84.
71. Lukens MV, van de Pol AC, Coenjaerts FE, et al. A systemic neutrophil response precedes robust CD8(+) T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants. *J Virol* 2010;84:2374-83.
72. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;112:1557-69.
73. Paul WE, Seder RA. Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 1994;76:241-51.
74. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-73.
75. Legg JP, Hussain IR, Warner JA, Johnston SL, Warner JO. Type 1 and type 2 cytokine imbalance in acute respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:633-9.
76. Aberle JH, Aberle SW, Dworzak MN, et al. Reduced interferon-gamma expression in peripheral blood mononuclear cells of infants with severe respiratory syncytial virus disease. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;160:1263-8.
77. Roman M, Calhoun WJ, Hinton KL, et al. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med* 1997;156:190-5.
78. Bendelja K, Gagro A, Bace A, et al. Predominant type-2 response in infants with respiratory syncytial virus (RSV) infection demonstrated by cytokine flow cytometry. *Clin Exp Immunol* 2000;121:332-8.
79. Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-41.
80. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
81. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677-88.

82. Joffre O, Santolaria T, Calise D, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 2008;14:88-92.
83. Wang J, Kong L, Luo Q, et al. Dual effects of respiratory syncytial virus infections on airway inflammation by regulation of Th17/Treg responses in ovalbumin-challenged mice. *Inflammation* 2014;37:1984-2005.
84. Mangodt TC, Van Herck MA, Nullens S, et al. The role of Th17 and Treg responses in the pathogenesis of RSV infection. *Pediatr Res* 2015;78:483-91.
85. Christiaansen AF, Syed MA, Ten Eyck PP, et al. Altered Treg and cytokine responses in RSV-infected infants. *Pediatr Res* 2016.
86. Luster AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998;338:436-45.
87. Bonecchi R, Galliera E, Borroni EM, Corsi MM, Locati M, Mantovani A. Chemokines and chemokine receptors: an overview. *Front Biosci* 2009;14:540-51.
88. Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999;20:254-7.
89. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-7.
90. IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *Cytokine* 2003;21:48-9.
91. Kelner GS, Kennedy J, Bacon KB, et al. Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 1994;266:1395-9.
92. Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, et al. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nature* 1997;385:640-4.
93. Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994;76:301-14.
94. Johnson Z, Proudfoot AE, Handel TM. Interaction of chemokines and glycosaminoglycans: a new twist in the regulation of chemokine function with opportunities for therapeutic intervention. *Cytokine Growth Factor Rev* 2005;16:625-36.
95. Murphy PM. The molecular biology of leukocyte chemoattractant receptors. *Annu Rev Immunol* 1994;12:593-633.
96. Bokoch GM. Chemoattractant signaling and leukocyte activation. *Blood* 1995;86:1649-60.

97. Wells TN, Power CA, Lusti-Narasimhan M, et al. Selectivity and antagonism of chemokine receptors. *J Leukoc Biol* 1996;59:53-60.
98. Nakano H, Mori S, Yonekawa H, Nariuchi H, Matsuzawa A, Kakiuchi T. A novel mutant gene involved in T-lymphocyte-specific homing into peripheral lymphoid organs on mouse chromosome 4. *Blood* 1998;91:2886-95.
99. Orlofsky A, Lin EY, Prystowsky MB. Selective induction of the beta chemokine C10 by IL-4 in mouse macrophages. *J Immunol* 1994;152:5084-91.
100. Cavcic A, Tesovic G, Gorenec L, Grgic I, Benic B, Lepej SZ. Concentration gradient of CXCL10 and CXCL11 between the cerebrospinal fluid and plasma in children with enteroviral aseptic meningitis. *Eur J Paediatr Neurol* 2011;15:502-7.
101. Ng PC, Li K, Chui KM, et al. IP-10 is an early diagnostic marker for identification of late-onset bacterial infection in preterm infants. *Pediatr Res* 2007;61:93-8.
102. Pharoah DS, Varsani H, Tatham RW, et al. Expression of the inflammatory chemokines CCL5, CCL3 and CXCL10 in juvenile idiopathic arthritis, and demonstration of CCL5 production by an atypical subset of CD8+ T cells. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R50.
103. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991;88:1121-7.
104. Gottlieb AB, Luster AD, Posnett DN, Carter DM. Detection of a gamma interferon-induced protein IP-10 in psoriatic plaques. *J Exp Med* 1988;168:941-8.
105. Grimm MC, Doe WF. Chemokines in Inflammatory Bowel Disease Mucosa: Expression of RANTES, Macrophage Inflammatory Protein (MIP)-1alpha, MIP-1beta, and gamma-Interferon-Inducible Protein-10 by Macrophages, Lymphocytes, Endothelial Cells, and Granulomas. *Inflamm Bowel Dis* 1996;2:88-96.
106. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, et al. Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996;382:635-8.
107. Luo H, Wang D, Che HL, Zhao Y, Jin H. Pathological observations of lung inflammation after administration of IP-10 in influenza virus- and respiratory syncytial virus-infected mice. *Exp Ther Med* 2012;3:76-9.
108. Zhang W, Choi Y, Haynes LM, et al. Vaccination to induce antibodies blocking the CX3C-CX3CR1 interaction of respiratory syncytial virus G protein reduces pulmonary inflammation and virus replication in mice. *J Virol* 2010;84:1148-57.

109. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, et al. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J* 1999;14:144-9.
110. McNamara PS, Flanagan BF, Hart CA, Smyth RL. Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2005;191:1225-32.
111. Noah TL, Ivins SS, Murphy P, Kazachkova I, Moats-Staats B, Henderson FW. Chemokines and inflammation in the nasal passages of infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Immunol* 2002;104:86-95.
112. Olszewska-Pazdrak B, Casola A, Saito T, et al. Cell-specific expression of RANTES, MCP-1, and MIP-1alpha by lower airway epithelial cells and eosinophils infected with respiratory syncytial virus. *J Virol* 1998;72:4756-64.
113. Smyth RL, Mobbs KJ, O'Hea U, Ashby D, Hart CA. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: disease severity, interleukin-8, and virus genotype. *Pediatr Pulmonol* 2002;33:339-46.
114. Miller AL, Bowlin TL, Lukacs NW. Respiratory syncytial virus-induced chemokine production: linking viral replication to chemokine production in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 2004;189:1419-30.
115. Zhang Y, Luxon BA, Casola A, Garofalo RP, Jamaluddin M, Brasier AR. Expression of respiratory syncytial virus-induced chemokine gene networks in lower airway epithelial cells revealed by cDNA microarrays. *J Virol* 2001;75:9044-58.
116. Vissers M, Schreurs I, Jans J, et al. Antibodies enhance CXCL10 production during RSV infection of infant and adult immune cells. *Cytokine* 2015;76:458-64.
117. Kim HH, Lee MH, Lee JS. Eosinophil cationic protein and chemokines in nasopharyngeal secretions of infants with respiratory syncytial virus (RSV) bronchiolitis and non-RSV bronchiolitis. *J Korean Med Sci* 2007;22:37-42.
118. Culley FJ, Pennycook AM, Tregoning JS, Hussell T, Openshaw PJ. Differential chemokine expression following respiratory virus infection reflects Th1- or Th2-biased immunopathology. *J Virol* 2006;80:4521-7.
119. Roe MF, Bloxham DM, Cowburn AS, O'Donnell DR. Changes in helper lymphocyte chemokine receptor expression and elevation of IP-10 during acute respiratory syncytial virus infection in infants. *Pediatr Allergy Immunol* 2011;22:229-34.
120. Chirkova T, Lin S, Oomens AG, et al. CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells. *J Gen Virol* 2015;96:2543-56.



121. Haeberle HA, Kuziel WA, Dieterich HJ, Casola A, Gatalica Z, Garofalo RP. Inducible expression of inflammatory chemokines in respiratory syncytial virus-infected mice: role of MIP-1alpha in lung pathology. *J Virol* 2001;75:878-90.
122. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, et al. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J Exp Med* 1998;187:129-34.
123. Sallusto F, Lenig D, Mackay CR, Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J Exp Med* 1998;187:875-83.
124. Kim CH, Rott L, Kunkel EJ, et al. Rules of chemokine receptor association with T cell polarization in vivo. *J Clin Invest* 2001;108:1331-9.
125. Ferres J. [Inhalation therapy in the newborn]. *An Esp Pediatr* 1992;36 Suppl 49:160-3.
126. Wood DW, Downes JJ, Lecks HI. A clinical scoring system for the diagnosis of respiratory failure. Preliminary report on childhood status asthmaticus. *Am J Dis Child* 1972;123:227-8.
127. Chapman JR, Waldenstrom J. With Reference to Reference Genes: A Systematic Review of Endogenous Controls in Gene Expression Studies. *PLoS One* 2015;10:e0141853.
128. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
129. Nielsen HE, Siersma V, Andersen S, et al. Respiratory syncytial virus infection--risk factors for hospital admission: a case-control study. *Acta Paediatr* 2003;92:1314-21.
130. Bont L, Checchia PA, Fauroux B, et al. Defining the Epidemiology and Burden of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Infants and Children in Western Countries. *Infect Dis Ther* 2016;5:271-98.
131. Pongiglione G, Possidoni A, di Luzio Paparatti U, et al. Incidence of Respiratory Disease During the First Two Years of Life in Children with Hemodynamically Significant Congenital Heart Disease in Italy: A Retrospective Study. *Pediatr Cardiol* 2016.
132. Figueras-Aloy J, Manzoni P, Paes B, et al. Defining the Risk and Associated Morbidity and Mortality of Severe Respiratory Syncytial Virus Infection Among Preterm Infants Without Chronic Lung Disease or Congenital Heart Disease. *Infect Dis Ther* 2016.
133. Stockman LJ, Curns AT, Anderson LJ, Fischer-Langley G. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among infants and young children in the United States, 1997-2006. *Pediatr Infect Dis J* 2012;31:5-9.

134. Hall CB, Weinberg GA, Blumkin AK, et al. Respiratory syncytial virus-associated hospitalizations among children less than 24 months of age. *Pediatrics* 2013;132:e341-8.
135. Garcia-Salido A, Onoro G, Melen GJ, et al. Serum sRAGE as a potential biomarker for pediatric bronchiolitis: a pilot study. *Lung* 2015;193:19-23.
136. Greenes DS, Harper MB. Low risk of bacteremia in febrile children with recognizable viral syndromes. *Pediatr Infect Dis J* 1999;18:258-61.
137. Cebey-Lopez M, Pardo-Seco J, Gomez-Carballa A, et al. Bacteremia in Children Hospitalized with Respiratory Syncytial Virus Infection. *PLoS One* 2016;11:e0146599.
138. Ralston S, Hill V, Waters A. Occult serious bacterial infection in infants younger than 60 to 90 days with bronchiolitis: a systematic review. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2011;165:951-6.
139. Purcell K, Fergie J. Concurrent serious bacterial infections in 2396 infants and children hospitalized with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infections. *Arch Pediatr Adolesc Med* 2002;156:322-4.
140. Purcell K, Fergie J. Lack of usefulness of an abnormal white blood cell count for predicting a concurrent serious bacterial infection in infants and young children hospitalized with respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection. *Pediatr Infect Dis J* 2007;26:311-5.
141. Beggs S, Wong ZH, Kaul S, Ogden KJ, Walters JA. High-flow nasal cannula therapy for infants with bronchiolitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2014;CD009609.
142. McKiernan C, Chua LC, Visintainer PF, Allen H. High flow nasal cannulae therapy in infants with bronchiolitis. *J Pediatr* 2010;156:634-8.
143. Gonzalez Martinez F, Gonzalez Sanchez MI, Rodriguez Fernandez R. [Clinical impact of introducing ventilation with high flow oxygen in the treatment of bronchiolitis in a paediatric ward]. *An Pediatr (Barc)* 2013;78:210-5.
144. Derscheid RJ, Ackermann MR. The innate immune system of the perinatal lung and responses to respiratory syncytial virus infection. *Vet Pathol* 2013;50:827-41.
145. Kordek A, Loniewska B, Podraza W, Nikodemski T, Rudnicki J. Usefulness of estimation of blood procalcitonin concentration versus C-reactive protein concentration and white blood cell count for therapeutic monitoring of sepsis in neonates. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2014;68:1516-23.
146. Machado JR, Soave DF, da Silva MV, et al. Neonatal sepsis and inflammatory mediators. *Mediators Inflamm* 2014;2014:269681.



147. Ng PC, Lam HS. Biomarkers in neonatology: the next generation of tests. *Neonatology* 2012;102:145-51.
148. El Saleeby CM, Bush AJ, Harrison LM, Aitken JA, Devincenzo JP. Respiratory syncytial virus load, viral dynamics, and disease severity in previously healthy naturally infected children. *J Infect Dis* 2011;204:996-1002.
149. Jansen RR, Schinkel J, Dek I, et al. Quantitation of respiratory viruses in relation to clinical course in children with acute respiratory tract infections. *Pediatr Infect Dis J* 2010;29:82-4.
150. Wright PF, Gruber WC, Peters M, et al. Illness severity, viral shedding, and antibody responses in infants hospitalized with bronchiolitis caused by respiratory syncytial virus. *J Infect Dis* 2002;185:1011-8.
151. Bennett BL, Garofalo RP, Cron SG, et al. Immunopathogenesis of respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis* 2007;195:1532-40.
152. Dinarello CA. Cytokines as endogenous pyrogens. *J Infect Dis* 1999;179 Suppl 2:S294-304.
153. Kruse J. Fever in children. *Am Fam Physician* 1988;37:127-35.
154. Schmitt BD. Fever in childhood. *Pediatrics* 1984;74:929-36.
155. Schroeder AR, Mansbach JM. Recent evidence on the management of bronchiolitis. *Curr Opin Pediatr* 2014;26:328-33.
156. Heidema J, Lukens MV, van Maren WW, et al. CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections. *J Immunol* 2007;179:8410-7.
157. Wilson CB. Immunologic basis for increased susceptibility of the neonate to infection. *J Pediatr* 1986;108:1-12.
158. Adkins B. T-cell function in newborn mice and humans. *Immunol Today* 1999;20:330-5.
159. Karenberg K, Hudalla H, Frommhold D. Leukocyte recruitment in preterm and term infants. *Mol Cell Pediatr* 2016;3:35.
160. SchrodL W, Buchler R, Wendler S, et al. Acute phase proteins as promising biomarkers: Perspectives and limitations for human and veterinary medicine. *Proteomics Clin Appl* 2016.
161. Diaz PV, Valdivia G, Gaggero AA, et al. Pro-Inflammatory Cytokines in Nasopharyngeal Aspirate From Hospitalized Children With Respiratory Syncytial Virus Infection With or Without Rhinovirus Bronchiolitis, and Use of the Cytokines as Predictors of Illness Severity. *Medicine (Baltimore)* 2015;94:e1512.

162. Diaz PV, Gaggero AA, Pinto RA, Mamani R, Uasapud PA, Bono MR. [Levels of inflammatory cytokines and plasma cortisol in respiratory syncytial virus bronchiolitis]. *Rev Med Chil* 2013;141:574-81.
163. Christiaansen AF, Knudson CJ, Weiss KA, Varga SM. The CD4 T cell response to respiratory syncytial virus infection. *Immunol Res* 2014;59:109-17.
164. Moreno-Solis G, Torres-Borrego J, de la Torre-Aguilar MJ, Fernandez-Gutierrez F, Llorente-Cantarero FJ, Perez-Navero JL. Analysis of the local and systemic inflammatory response in hospitalized infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Allergol Immunopathol (Madr)* 2015;43:264-71.
165. Brandenburg AH, Kleinjan A, van Het Land B, et al. Type 1-like immune response is found in children with respiratory syncytial virus infection regardless of clinical severity. *J Med Virol* 2000;62:267-77.
166. Hussell T, Spender LC, Georgiou A, O'Garra A, Openshaw PJ. Th1 and Th2 cytokine induction in pulmonary T cells during infection with respiratory syncytial virus. *J Gen Virol* 1996;77 ( Pt 10):2447-55.
167. Lemanske RF, Jr. Does respiratory syncytial viral-induced bronchiolitis result from helper T cell type 1/type 2 cytokine imbalance? *Am J Respir Crit Care Med* 2003;168:625-7.
168. Mobbs KJ, Smyth RL, O'Hea U, Ashby D, Ritson P, Hart CA. Cytokines in severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 2002;33:449-52.
169. Smith NL, Denning DW. Clinical implications of interferon-gamma genetic and epigenetic variants. *Immunology* 2014;143:499-511.
170. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
171. Durant LR, Makris S, Voorburg CM, Loebbermann J, Johansson C, Openshaw PJ. Regulatory T cells prevent Th2 immune responses and pulmonary eosinophilia during respiratory syncytial virus infection in mice. *J Virol* 2013;87:10946-54.
172. Ruckwardt TJ, Bonaparte KL, Nason MC, Graham BS. Regulatory T cells promote early influx of CD8+ T cells in the lungs of respiratory syncytial virus-infected mice and diminish immunodominance disparities. *J Virol* 2009;83:3019-28.
173. Zhu YF, Zhu JY, Li WW, Lan CF, Fang J, Lin HL. [Relationship of levels of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells and expression of Foxp3 mRNA in peripheral blood with serum immunoglobulin E level in children with bronchiolitis]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2009;11:349-53.

174. Assefa D, Amin N, Dozor AJ, Parton LA. Attenuated interleukin-8/leukocyte immunoresponse in preterm infants compared with term infants hospitalized with respiratory syncytial virus bronchiolitis: a pilot study. *Hum Immunol* 2011;72:708-11.
175. Santini F. Human respiratory syncytial virus and Th1 chemokines. *Clin Ter* 2015;166:e203-8.
176. Nicholson EG, Schlegel C, Garofalo RP, et al. Robust Cytokine and Chemokine Response in Nasopharyngeal Secretions: Association With Decreased Severity in Children With Physician Diagnosed Bronchiolitis. *J Infect Dis* 2016;214:649-55.
177. Zou LP, Xu XJ, Zhang Y, Wang W. [Roles of CXCR3 on lymphocytes and IP-10 of peripheral blood in infants with bronchiolitis]. *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi* 2015;17:155-8.
178. Ermers MJ, Janssen R, Onland-Moret NC, et al. IL10 family member genes IL19 and IL20 are associated with recurrent wheeze after respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Res* 2011;70:518-23.
179. Su YC, Townsend D, Herrero LJ, et al. Dual proinflammatory and antiviral properties of pulmonary eosinophils in respiratory syncytial virus vaccine-enhanced disease. *J Virol* 2015;89:1564-78.
180. Vojvoda V, Savic Mlakar A, Jergovic M, et al. The increased type-1 and type-2 chemokine levels in children with acute RSV infection alter the development of adaptive immune responses. *Biomed Res Int* 2014;2014:750521.
181. Folsgaard NV, Chawes BL, Bonnelykke K, Jenmalm MC, Bisgaard H. Cord blood Th2-related chemokine CCL22 levels associate with elevated total-IgE during preschool age. *Clin Exp Allergy* 2012;42:1596-603.
182. Joshi P, Kakakios A, Jayasekera J, Isaacs D. A comparison of IL-2 levels in nasopharyngeal and endotracheal aspirates of babies with respiratory syncytial viral bronchiolitis. *J Allergy Clin Immunol* 1998;102:618-20.

## ANEXOS

---

## Anexo II.

### HOJA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LOS PADRES

**TÍTULO DEL ESTUDIO: PATRON DE EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS, INTERLEUQUINAS Y LINFOCITOS TIPO T EN BRONQUIOLITIS GRAVE**

Yo .....

He leído la hoja de información que el médico que firma esta hoja me ha dado. He tenido tiempo para pensar y le he preguntado las dudas que tenía y me las ha resuelto de forma adecuada y por tanto entiendo claramente para qué se hace este estudio.

Comprendo que la participación de mi ..... (relación con el paciente) es voluntaria y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin dar explicaciones y sin que esto cambie su atención médica.

Firma del padre, madre tutor	Fecha	Nombre del padre, madre o tutor y DNI
------------------------------	-------	---------------------------------------

Firma del médico	Fecha	Nombre y DNI
------------------	-------	--------------

#### APARTADO PARA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo ..... revoco el consentimiento de participación de mi ..... (relación con el paciente) en el estudio arriba firmado con fecha .....

Nombre del padre, madre o tutor y DNI

Fecha de la revocación .....

Firma

Protocolo versión 1; Octubre 2012

## Anexo III.

### HOJA DE INFORMACIÓN PARA LOS PADRES O TUTORES

#### **TÍTULO DEL ESTUDIO: PATRON DE EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS, INTERLEUQUINAS Y LINFOCITOS TIPO T EN BRONQUIOLITIS GRAVE**

Su hijo ha sido diagnosticado de bronquiolitis. Esta enfermedad suele afectar a los niños más pequeños y en general está provocada por virus, conocida desde hace mucho tiempo aunque en el momento actual no es posible establecer de forma segura el pronóstico a corto plazo de estos niños (en general bueno). En la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús estamos realizando un estudio en los niños que tiene bronquiolitis.

#### **¿Qué es lo que estamos haciendo?**

El objetivo principal de este estudio es intentar conocer si hay algún marcador en la sangre (en concreto en los linfocitos que nos defienden de las infecciones) que pueda predecir la evolución clínica a corto plazo en los niños diagnosticados de bronquiolitis.

#### **¿Por qué es importante poder predecir la evolución de los niños con bronquiolitis?**

Poder predecir la evolución de los niños con bronquiolitis es importante, ya que desde el ingreso se podrían tomar medidas que intentaran paliar la mala evolución que algún grupo reducido de niños padece.

#### **¿Qué es lo que le pedimos?**

En primer lugar, le pedimos que nos permita utilizar los datos de la historia clínica de su hijo; por otro lado le pedimos que nos permita extraer en una ocasión (siempre durante las primeras 24 horas de ingreso en la Unidad) 2 ml de sangre para analizarla posteriormente (los marcadores que queremos investigar no están disponibles en los laboratorios habituales). Si nos permite hacerlo, tenga en cuenta que dichas extracciones de sangre se realizarán sólo si la vía periférica de su hijo refluye y creamos que esto no deteriorará más todavía la patología de su hijo. En ningún caso se pinchará a su hijo con el único objetivo de extraer estas muestras.

#### **¿Qué es lo que tiene que hacer?**

Si decide que su hijo participe, tendrá que firmar en una hoja de consentimiento informado. Esta decisión es voluntaria y no influirá en el tratamiento que le pautará el médico. Tampoco se le van a hacer más análisis ni otro tipo de pruebas por participar en este estudio. La participación es voluntaria y podrá revocarla en cualquier momento, sin dar explicaciones y sin que esto tenga consecuencias en la atención médica.

#### **¿Obtendrá su hijo algún beneficio por participar en el estudio?**

El niño no tendrá ningún efecto beneficioso con la participación en este estudio; sin embargo contribuirá a mejorar el conocimiento de la bronquiolitis, pudiendo ser de utilidad para el tratamiento de otros niños en el futuro.

#### **¿Qué pasará con los datos y resultados del estudio?**

Los resultados de este estudio podrán utilizarse para publicarlos en revistas científicas o comunicarlos en Congresos y Reuniones científicas. Todos los datos pertenecerán a la historia clínica del niño y aquellos que se extraigan de ella para el estudio estarán codificados para que el nombre de su hijo no aparezca en ningún documento fuera del hospital. La utilización de los datos se hará cumpliéndose lo establecido en las Leyes vigentes en España de protección de datos (LOPD) Ley Orgánica 15/1999 de 13 de diciembre de Protección de Datos de Carácter Personal. El estudio cumple las normas de la Declaración de Helsinki y ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de este hospital.

En caso de tener cualquier duda puede ponerse en contacto con el Dr. Gonzalo Oñoro, en la Unidad de Cuidados Intensivos Pediátricos del Hospital Infantil Universitario Niño Jesús.

## Anexo IV.

**HOJA DE RECOGIDA DE DATOS BRONQUIOLITIS****DATOS EPIDEMIOLÓGICOS**

Nº Codificación.....

Sexo..... Varón / Mujer

Fecha de Nacimiento.....

Fecha de Ingreso Hospitalario.....

Fecha de Ingreso en CIP.....

Fecha de Alta en CIP.....

Fecha de Alta Hospitalaria.....

**Antecedentes Personales**

Prematuridad Cardiopatía Neumopatía

Sd. Polimalformativo Retraso Psicomotor

Ingreso previo semejante SI NO

Ingreso directo a UCIP SI NO

**DATOS CLÍNICOS**

Fiebre..... SI NO

Días de Evolución de la Clínica.....

Pausas de Apnea... SI NO

Escala de Wood-Downes (al ingreso) ....

	Leucocitos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	Neutrófilos ( $\times 10^3/\mu\text{L}$ )	PCR (mg/dl)	PCT (ng/ml)	SO <sub>2</sub> (%)	Soporte Respiratorio (Tipo Máximo)
<b>Hora 0</b>						

**PRUEBAS RADIOLÓGICAS**

Rx de Tórax.....SI NO (Nº )

Patológica?? ..... SI NO

Atelectasias Hiperinsuflación

Infiltrados Condensaciones

**SOPORTE RESPIRATORIO EN UCIP**

Total horas.....

**Máximo**

GN OAF CPAP BiPAP VMC

VAFO

**DATOS DE INFECCIÓN**

Sobreinfección bacteriana

No Probable Segura

Hemocultivo..... Positivo Negativo

Bacteria.....

VRS..... Positivo Negativo

N/R

**EVOLUCIÓN**

Exitus ..... SI NO

Reingreso a UCIP ..... SI NO

**TRATAMIENTO**

Antibiótico..... SI NO

Ampicilina Amoxicilina-Clavulánico

Cefotaxima Otro

Corticoides..... SI NO

Versión 1.0

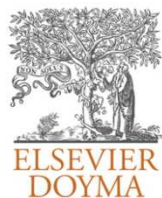
## Anexo V. Escala de valoración de la gravedad de bronquiolitis

Puntuación	Sibilancias	Tiraje	Frecuencia Respiratoria	Frecuencia Cardíaca	Ventilación	Cianosis
0	No	No	< 30	< 120	Simétrica Buena	No
1	Final de la Espiración	Subcostal Intercostal	31 - 45	> 120	Simétrica Regular	Si
1	Toda la Espiración	Supraclavicular ar Alateo Nasal	46 - 60		Muy Disminuida	
3	Inspiración + Espiración	Supraesternal + Intercostal	> 60		Tórax Silente	



## Anexo VI. Artículos del doctorando en relación con Bronquiolitis

An Pediatr (Barc). 2011;74(6):371–376



ANALES DE PEDIATRÍA

www.elsevier.es/anpediatr



ORIGINAL

### Bronquiolitis grave. Cambios epidemiológicos y de soporte respiratorio

G. Oñoro\*, E. Pérez Suárez, M.I. Iglesias Bouzas, A. Serrano, A. Martínez De Azagra, M.A. García-Teresa y J. Casado Flores

Servicio de Cuidados Intensivos Pediátricos, Hospital Infantil Universitario Niño Jesús, Madrid, España

Recibido el 30 de octubre de 2010; aceptado el 11 de enero de 2011

Disponible en Internet el 3 de marzo de 2011

#### PALABRAS CLAVE

Bronquiolitis;  
Virus respiratorio  
sincitial;  
Epidemiología;  
Cuidados intensivos;  
Soporte respiratorio;  
Ventilación no  
invasiva

#### Resumen

**Introducción:** La bronquiolitis genera muchos ingresos en las unidades de cuidados intensivos pediátricos (UCIP). Nuevas formas de soporte respiratorio podrían mejorar la asistencia de estos pacientes.

**Objetivo:** Analizar los cambios epidemiológicos y de soporte respiratorio de los niños ingresados en la UCIP.

**Pacientes y métodos:** Estudio observacional y retrospectivo de los pacientes ingresados por bronquiolitis en la UCIP de un hospital terciario durante la época epidémica del virus respiratorio sincitial (VRS) entre los años 2005 y 2010.

**Resultados:** Fueron ingresados 229 pacientes; el 83% estaba infectado por VRS. La media de edad fue de 1,48 meses; los menores de 3 meses generaron el mayor número de ingresos (73,3%). Diciembre fue el mes con más número de ingresos (52%). La mortalidad fue del 0,9%. La media de estancia en UCIP y de soporte respiratorio fue de 4 y 3 días (diferencias no significativas entre las diferentes epidemias). Los pacientes con bronquiolitis por VRS eran de menor edad que los VRS negativo (media 2,61 y 4,05 meses;  $p=0,023$ ). El 73% de los casos requirieron soporte respiratorio. El porcentaje de pacientes en los que se utilizó soporte respiratorio activo fue en aumento ( $Z=3,81$ ;  $p=0,00014$ ), sobre todo a expensas de la oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales ( $Z=3,62$ ;  $p=0,00028$ ). Se observó relación inversa entre la edad y los días de estancia en UCIP ( $\beta=-0,245$ ;  $p \leq 0,0001$ ) y de soporte respiratorio ( $\beta=-0,167$ ;  $p=0,039$ ).

**Conclusiones:** La mayoría de los pacientes ingresados por bronquiolitis en la UCIP tienen menos de 3 meses. La mortalidad es del 0,9%. El soporte respiratorio (sobre todo la ventilación mecánica no invasiva y la oxigenoterapia de alto flujo en cánulas nasales) se utiliza cada vez más frecuentemente. A menor edad, más días de ingreso en UCIP y de soporte respiratorio son necesarios.

© 2010 Asociación Española de Pediatría. Publicado por Elsevier España, S.L. Todos los derechos reservados.

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: gonorootero@hotmail.com (G. Oñoro).

**KEYWORDS**

Bronchiolitis;  
Respiratory syncytial  
virus;  
Epidemiology;  
Critical care unit;  
Respiratory support;  
Non-invasive positive  
pressure ventilation

**Severe bronchiolitis. Changes in epidemiology and respiratory support****Abstract**

**Introduction:** Bronchiolitis generates lots of admissions during the cold months in the paediatric intensive care units (PICU). New forms of respiratory support are being used and could improve the care of these patients.

**Objectives:** To analyse the epidemiological and respiratory support changes of children admitted to the PICU.

**Patients and methods:** An observational, retrospective, descriptive and analytical study of patients with the diagnosis of bronchiolitis admitted to the PICU of a tertiary hospital during the respiratory syncytial virus (RSV) epidemic months between 2005 and 2010.

**Results:** A total of 229 patients were admitted, of whom 83% were infected with RSV. The mean age was 1.48 months, with children under 3 months being the greatest number of admissions (73.3%). December was the month with the highest number of admissions (52%). Mortality was 0.9%. The mean time of stay in the PICU and on respiratory assistance were 4 and 3 days, respectively (no significant differences between the periods studied). Patients with RSV bronchiolitis were younger than the negative RSV (mean 2.61 months and 4.05 months,  $P = .023$ ). Active respiratory support was required in 73% of cases. The percentage of patients who required active respiratory support increased over the years ( $Z = 3.81$ ,  $P = .00014$ ), especially high flow nasal oxygen therapy ( $Z = 3.62$ ,  $P = .00028$ ). An inverse relationship was observed between patient age and length of stay in PICU ( $\text{Beta} = -0.245$ ,  $P \leq .0001$ ) and days on respiratory support ( $\text{Beta} = -0.167$ ,  $P = .039$ ).

**Conclusions:** Most patients admitted to the PICU are less than 3 months old. Mortality was 0.9%. Respiratory support (especially non-invasive mechanical ventilation and high flow nasal oxygen therapy) is used increasingly often. The youngest patients need more days in PICU and more respiratory support.

© 2010 Asociación Española de Pediatría. Published by Elsevier España, S.L. All rights reserved.

**Introducción**

La bronquiolitis es la infección de vías respiratorias bajas más frecuente en los primeros años de vida. Hasta un 80% de los casos está causado por el virus respiratorio sincitial (VRS), cuya incidencia es mayor durante los meses fríos del año<sup>1,2</sup>. De entre los niños que presentan bronquiolitis, del 1 al 5% requieren ingreso en el hospital y de ellos hasta un 15% precisa atención en la unidad de cuidados intensivos pediátricos (UCIP) debido a la gravedad del proceso (por la propia insuficiencia respiratoria o por las complicaciones asociadas a la enfermedad)<sup>3</sup>.

Durante los meses de invierno, la bronquiolitis supone una gran carga asistencial y de recursos a las diversas UCIP<sup>4,5</sup>. Las opciones de tratamiento médico de que se disponen son muy limitadas, ya que no han demostrado eficacia en diversos estudios realizados y la mayoría de las guías clínicas no los recomiendan. Sin embargo, las medidas de soporte general y respiratorio siguen siendo los estándares de tratamiento para el manejo de la bronquiolitis, ya que son las únicas opciones que han demostrado ser eficaces con un alto grado de evidencia<sup>6-11</sup>.

Hace unos años, la ventilación mecánica invasiva era la única forma de soporte respiratorio cuando la gravedad de la bronquiolitis lo exigía. En los últimos años han ido apareciendo diversos estudios que proponen a la ventilación no invasiva como el pilar fundamental de tratamiento de estos niños<sup>12-18</sup>.

El objetivo de este estudio es analizar los cambios epidemiológicos y en el soporte respiratorio de los niños

ingresados por bronquiolitis en la UCIP y estudiar si el VRS ha causado mayor morbilidad a lo largo de las sucesivas epidemias.

**Pacientes y métodos**

Se realizó un estudio observacional, retrospectivo, descriptivo y analítico de los pacientes ingresados en la UCIP de un hospital terciario. Fueron incluidos todos los pacientes con el diagnóstico de bronquiolitis atendidos en la UCIP durante la época epidémica de VRS (de octubre a marzo, ambos inclusive) entre los años 2005 y 2010 (5 periodos epidémicos consecutivos).

Los criterios de ingreso en la UCIP fueron el deterioro clínico del paciente por insuficiencia respiratoria grave clínica (definida como aumento progresivo del trabajo respiratorio pese a tratamiento médico o presencia de frecuentes pausas de apnea con bradicardia o cianosis) o analítica (necesidades de fracción inspiratoria de O<sub>2</sub> mayor de 0,4 para mantener saturación de oxígeno mayor del 92% o presión parcial de CO<sub>2</sub> mayor de 55 mmHg). Se definió sobreinfección bacteriana cuando se encontraron datos analíticos compatibles con la misma (aumento de proteína C reactiva o procalcitonina tres veces por encima de la normalidad, leucocitosis > 15.000/μl, neutrofilia > 10.000/μl) o aislamiento bacteriano en los hemocultivos realizados.

La recogida de datos se realizó mediante revisión de las historias clínicas de los pacientes ingresados por bronquiolitis en la UCIP en los periodos señalados. De cada paciente se recogieron los siguientes datos: edad, sexo, antecedentes



personales de riesgo para presentar una bronquiolitis grave (prematuridad, enfermedad cardíaca o pulmonar crónica, síndromes polimalformativos), presencia de VRS en secreciones nasales, procedencia del ingreso, fecha de ingreso, días de estancia en la UCIP, tipo de asistencia respiratoria (oxigenoterapia simple en gafas nasales, oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales, ventilación no invasiva, ventilación mecánica convencional, ventilación de alta frecuencia), tiempo de asistencia respiratoria, otros tipos de tratamiento respiratorio (heliox, surfactante y óxido nítrico) sospecha de sobreinfección bacteriana y mortalidad. La detección de VRS se realizó mediante inmunocromatografía de membrana en secreciones nasales. Para poder realizar comparaciones se dividió la muestra en los cinco periodos anuales anteriormente descritos.

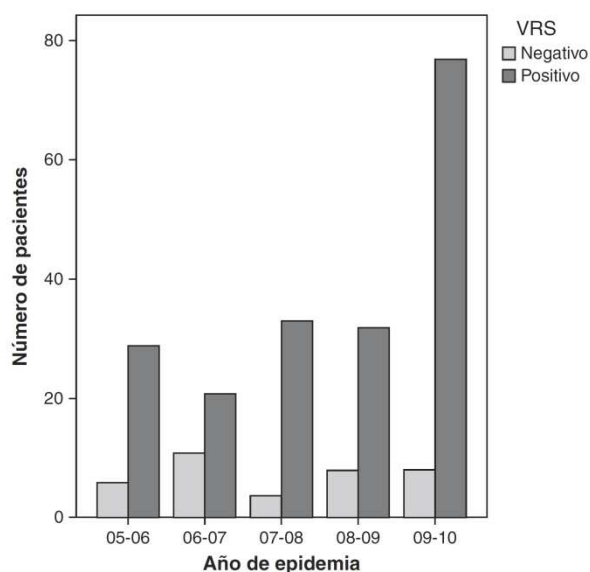
La decisión del tipo de ventilación dependió de las necesidades de cada paciente y del médico que lo atendió. Los respiradores usados para ventilación mecánica convencional fueron Babylog® o SERVO-i®; para la ventilación no invasiva se utilizó Infant Flow Advance® o BiPAP Vision®; para oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales se emplearon el sistema Vaphotherm® (Precision Flow® o 2000i®) y el sistema Fisher Paykel®, y el respirador Sensormedics® para la ventilación de alta frecuencia.

El análisis de datos se realizó con el paquete estadístico SPSS versión 15.0. Se utilizó la prueba de la  $\chi^2$  de Mantel-Haenszel para comprobar si existió tendencia lineal en el porcentaje de pacientes sometidos a diferentes tipos de soporte respiratorio y de las diferentes variables epidemiológicas a lo largo de las sucesivas epidemias. Para comparar los resultados entre las diferentes epidemias se utilizó el análisis de la varianza (pruebas post hoc de Bonferroni para comparaciones múltiples). Se consideraron significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

## Resultados

En los 5 periodos epidémicos de VRS estudiados fueron ingresados por bronquiolitis en la UCIP un total de 229 pacientes, de los cuales 133 (58%) fueron varones. Precizaron algún tipo de soporte respiratorio diferente de la oxigenoterapia en gafas nasales 167 de ellos (73%). En la última epidemia se observó un gran aumento del número de ingresos (86 casos) frente a la media de ingresos de los años anteriores (36 casos). Diciembre fue el mes con más número de ingresos (119; 52%) seguido de noviembre (41; 17,9%) y enero (40; 17,5%). Durante el periodo estudiado fallecieron 2 pacientes (mortalidad 0,9%); uno de ellos era un lactante sano de un mes de vida y el otro, de 6 meses de edad, presentaba un cuadro polimalformativo no filiado que precisaba CPAP nasal domiciliaria.

Se observó una tendencia significativa en el número de ingresos por bronquiolitis VRS positivo con el paso de los años (prueba de la  $\chi^2$  de Mantel-Haenszel:  $Z = 1,99$ ;  $p = 0,046$ ), mientras que el número de bronquiolitis VRS negativas se mantuvo estable (fig. 1). Los pacientes con bronquiolitis por VRS eran de menor edad que los VRS negativo (media de edad 2,61 y 4,05 meses, respectivamente;  $p = 0,023$ ), pero no se encontró que los pacientes VRS positivo precisaran más días de ingreso en UCIP ni días de ventilación mecánica. Se encontró una correlación inversa entre la edad y los días de



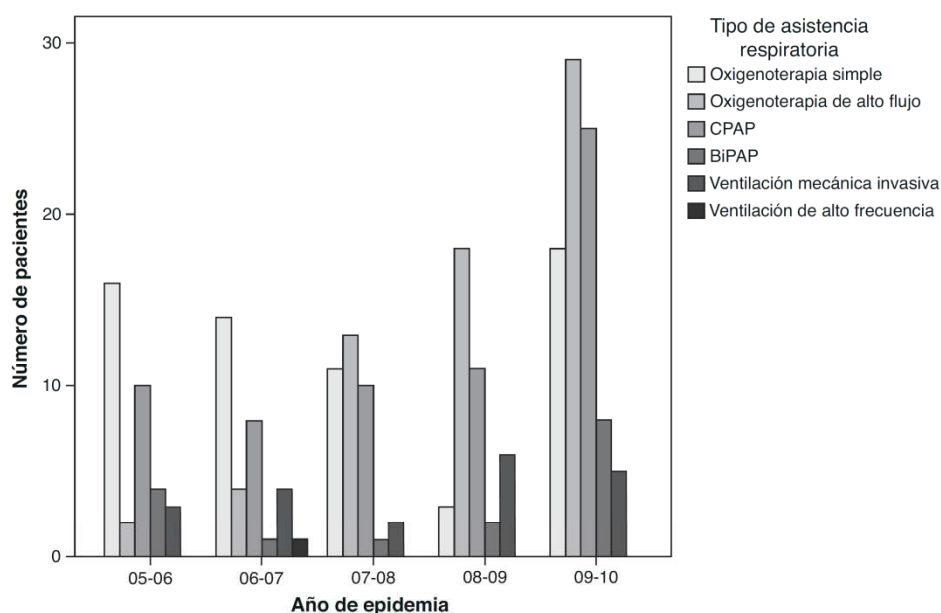
**Figura 1** Distribución de pacientes según año de epidemia y positividad del VRS. Al analizar el porcentaje de pacientes VRS positivo se encontró una tendencia lineal significativa con el paso de los años ( $Z = 1,99$ ;  $p = 0,046$ ).

estancia en UCIP ( $\beta = -0,245$ ;  $p \leq 0,0001$ ), así como con los días de ventilación mecánica ( $\beta = -0,167$ ;  $p = 0,039$ ), de tal forma que cuanto menor era el paciente, más días de ingreso y de soporte respiratorio precisó.

De los 229 pacientes estudiados, 167 (73%) requirieron algún tipo de soporte respiratorio diferente de la oxigenoterapia simple en gafas nasales. Veinte de ellos (12,9%) precisaron ventilación mecánica convencional, 80 (50,2%) ventilación mecánica no invasiva (en forma de CPAP y/o BiPAP) y 66 (42,9%) oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales; sólo un paciente requirió ventilación de alta frecuencia. Ningún paciente recibió tratamiento con surfactante pulmonar ni óxido nítrico y tan sólo a 2 de ellos se les administró heliox durante los 5 periodos estudiados.

El porcentaje de pacientes en los que se usó la oxigenoterapia simple fue menor a lo largo de los años ( $Z = -3,64$ ;  $p = 0,00028$ ), mientras que el uso de soporte respiratorio (en forma de ventilación no invasiva u oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales) aumentó con el paso de éstos ( $Z = 3,81$ ;  $p = 0,00014$ ). Sin embargo, no hubo cambio significativo en el porcentaje de pacientes sometidos a ventilación mecánica no invasiva ( $Z = 0,27$ ;  $p = 0,78$ ) con el paso de los años, mientras que la oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales experimentó en su uso una tendencia lineal significativa ( $Z = 3,62$ ;  $p = 0,00028$ ). El uso de ventilación mecánica convencional ha ido disminuyendo, aunque sin alcanzar significación estadística ( $Z = -0,54$ ;  $p = 0,59$ ) (fig. 2).

En todos los casos se pudo investigar la presencia de VRS en secreciones nasales, resultando positivo en 192 (83%). No hubo ninguna coinfección con otros virus estudiados (adenovirus e influenzae). Globalmente, 49 pacientes (21%) presentaban algún antecedente personal de riesgo que pudiera condicionar el presentar una bronquiolitis grave,



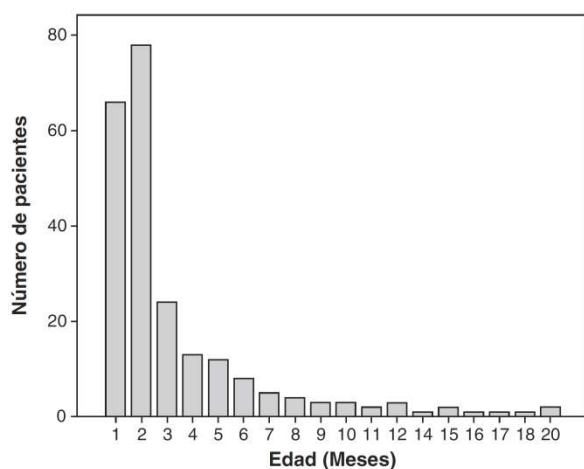
**Figura 2** Distribución de pacientes según año de epidemia y asistencia respiratoria. La tendencia lineal en el porcentaje de pacientes según el tipo de asistencia sólo resultó significativa para la de oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales ( $Z = 3,62$ ;  $p = 0,00028$ ) y la oxigenoterapia simple ( $Z = -3,64$ ;  $p = 0,00028$ ).

siendo la prematuridad el más frecuente de ellos (39; 17%). El resto de los pacientes (180; 79%) se consideraron sanos.

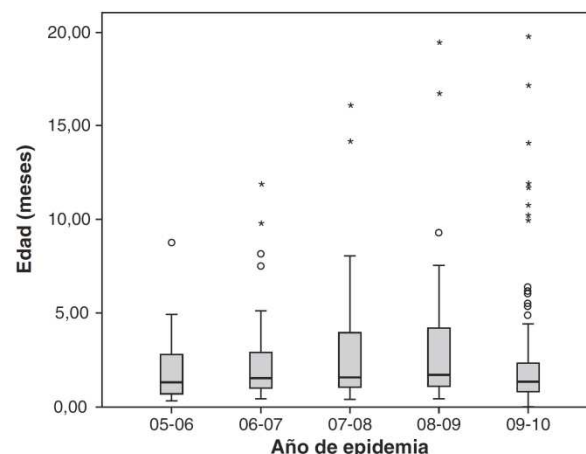
La media de edad fue de 1,48 meses (rango 0,43-19,71). Los menores de 3 meses fueron los que mayor número de ingresos generaron (168 pacientes; 73,3%) (fig. 3). No se encontraron diferencias en la media de edad entre los diferentes años estudiados (fig. 4). Respecto a la procedencia del paciente antes de ingresar en la UCIP, 118 (51,5%) procedían de otros hospitales, 77 (33,6%) de la planta de hospitalización del propio hospital y 34 (14,8%) directamente desde el servicio de urgencias. Se sospechó sobreinfección bacteriana en 66 pacientes (28,8%), la mayoría de los cuales eran VRS

positivo (59; 89%), aunque no se encontraron diferencias al hacer la comparación con los VRS negativos.

La media de estancia en UCIP fue de 4 días (rango 0-24); la mayoría de los pacientes (158; 69%) requirió menos de 5 días de ingreso mientras que tan sólo 9 (3,9%) precisaron más de 10 días. La media de duración del soporte respiratorio fue de 3 días (rango 0-23). Más de la mitad de los niños ingresados requirieron al menos 3 días de soporte respiratorio (90; 58,4%), aunque rara vez este tratamiento se prolongó más de 10 días (6; 3,8%). No se encontraron dife-

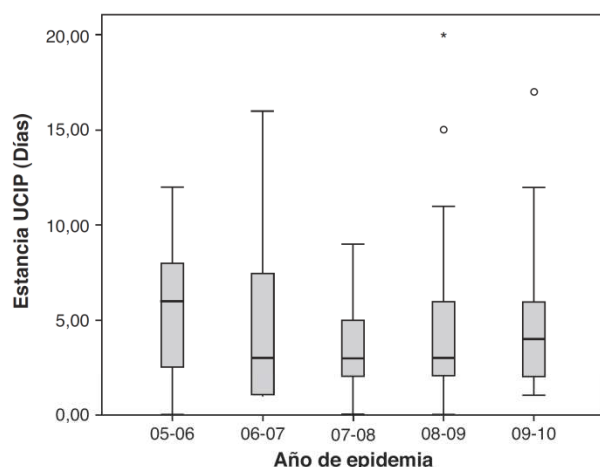


**Figura 3** Distribución de pacientes por edades (total de la muestra).



**Figura 4** Distribución de la variable edad (meses decimales) en las diferentes epidemias. La raya negra horizontal representa la mediana y los extremos de la caja el primer y tercer cuartil. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (análisis de la varianza con prueba post hoc de Bonferroni).



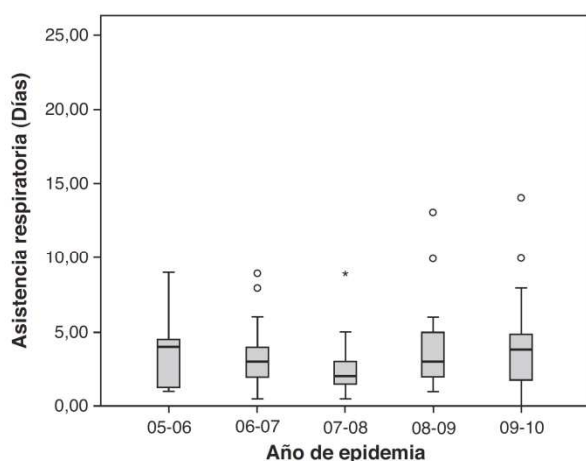


**Figura 5** Distribución de la variable duración de estancia en UCIP (días) en las diferentes epidemias. La raya negra horizontal representa la mediana y los extremos de la caja el primer y tercer cuartil. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (análisis de la varianza con prueba post hoc de Bonferroni).

rencias significativas en la duración del ingreso en UCIP ni de la asistencia respiratoria de los cinco periodos epidémicos (figs. 5 y 6).

## Discusión

La bronquiolitis es la enfermedad que más frecuentemente genera ingresos hospitalarios en menores de un año<sup>1,19</sup> y es clásicamente durante los meses fríos cuando su incidencia es mayor, coincidiendo con la época epidémica del VRS<sup>3-5,20,21</sup>. De todos los pacientes ingresados en un hospital por bron-



**Figura 6** Distribución de la variable duración de la asistencia respiratoria (días) en las diferentes epidemias. La raya negra horizontal representa la mediana y los extremos de la caja el primer y tercer cuartil. No se observaron diferencias estadísticamente significativas (análisis de la varianza con prueba post hoc de Bonferroni).

quiolitis, las series estiman que hasta un 15% requerirán tratamiento en la UCIP<sup>3,19</sup>.

En nuestro estudio, y al igual que en otras series publicadas en la literatura, hemos encontrado que la gran mayoría de los niños con bronquiolitis que requieren ingreso en nuestra UCIP el cuadro está producido por el VRS (83%) y es alrededor del mes de diciembre cuando el pico de ingresos aumenta de tal forma que genera una importante carga de trabajo a las UCIP<sup>2,19,20</sup>. En concordancia con otros estudios, casi tres cuartas partes de los niños de nuestra serie eran menores de 3 meses de edad<sup>1,3,19</sup>. Pese a que los factores para tener una bronquiolitis grave están bien definidos<sup>20,22,23</sup>, la mayoría de los niños que ingresaron en nuestra UCIP durante los periodos estudiados eran niños sanos; de hecho, en la última década se ha puesto de manifiesto la importancia de otros factores que contribuirían a la severidad de la infección (ambientales, dependientes de la respuesta inmunitaria del huésped y del propio virus)<sup>24</sup>. Aunque la bronquiolitis es una enfermedad que genera mucha morbilidad, la mortalidad suele ser escasa<sup>22,25</sup>, en nuestra serie del 0,9%.

Los tratamientos médicos para la bronquiolitis están en constante análisis y ninguno ha demostrado verdadera eficacia<sup>6-8,10,11</sup>. Estudios recientes han publicado resultados prometedores sobre la ventilación no invasiva y afirman que ésta debería ser una parte fundamental del tratamiento en las bronquiolitis<sup>12-18</sup> y la mayoría de las guías clínicas las recomienda con un alto nivel de evidencia<sup>9</sup>. En nuestra experiencia, la ventilación no invasiva y la oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales (en especial ésta última) son parte fundamental en el cuidado de los niños que ingresan en cuidados intensivos con el diagnóstico de bronquiolitis; de hecho, el 64% de estos niños fue tratado con estas medidas de soporte. En nuestra serie de casos este tipo de asistencia ha sido cada vez más usada con el paso de los años, aunque no encontramos que con ella se disminuyera la morbilidad de estos niños en cuanto a días de ingreso en UCIP o de ventilación mecánica de forma significativa. A pesar de ello, la ventilación no invasiva y la oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales son modalidades de asistencia respiratoria baratas, poco lesivas y fáciles de usar y además no requieren de personal ni unidades altamente cualificados para su uso, lo que hace de ella una forma de asistencia ideal en los niños con bronquiolitis.

Considerando la morbilidad de los pacientes como días de estancia en UCIP como los días de soporte respiratorio, nuestro estudio encontró que cuanto menor era la edad del paciente más días de ingreso y de ventilación mecánica fueron requeridos. Estos resultados confirman los hallados por otros autores<sup>3,19,22,23</sup>; de hecho, la edad menor de 6 semanas se considera un factor de riesgo para padecer una bronquiolitis grave.

La epidemia 2009-2010 dobló el número de ingresos por bronquiolitis en la UCIP respecto a la media de ingresos de las epidemias estudiadas. Otros autores han publicado estudios epidemiológicos con resultados en los que se observa que no sólo los ingresos hospitalarios por bronquiolitis son cada vez más frecuentes, sino que cada cierto tiempo una epidemia en concreto se desmarca de la tendencia anual mostrando un pico de incidencia mayor de lo esperado<sup>1,2</sup>. Sin embargo, aunque la incidencia de bronquiolitis en la última epidemia estudiada comparada con los años anteriores fue

mayor, no encontramos que ésta fuera más agresiva, ya que al comparar las medianas de estancia en UCIP y de días de soporte respiratorio no se encontraron diferencias.

En conclusión, la mayoría de los niños que requieren asistencia intensiva en la UCIP tienen menos de 3 meses de edad y 4 de cada 5 están infectados por el VRS. El soporte respiratorio fue necesario en tres de cada cuatro pacientes; la ventilación no invasiva fue la que se utilizó en la mitad de ellos y la oxigenoterapia de alto flujo con cánulas nasales en el 40%; sin embargo, tampoco es despreciable el porcentaje de pacientes que precisaron intubación y ventilación mecánica convencional (12,9%). El tiempo de ingreso en la UCIP y de asistencia respiratoria fue más prolongado en los niños de menor edad.

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

### Bibliografía

- Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*. 1999;282:1440-6.
- Vicente D, Montes M, Cilla G, Perez-Yarza EG, Perez-Trallero E. Hospitalization for respiratory syncytial virus in the paediatric population in Spain. *Epidemiol Infect*. 2003;131:867-72.
- Prais D, Schonfeld T, Amir J. Admission to the intensive care unit for respiratory syncytial virus bronchiolitis: a national survey before palivizumab use. *Pediatrics*. 2003;112:548-52.
- Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010;375:1545-55.
- Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, Auinger P, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*. 2009;360:588-98.
- Guerguerian AM, Farrell C, Gauthier M, Lacroix J. Bronchiolitis: what's next? *Pediatr Crit Care Med*. 2004;5:498-500.
- Subcommittee on Diagnosis, Management of Bronchiolitis. Diagnosis and management of bronchiolitis. *Pediatrics*. 2006;118:1774-93.
- Davison C, Ventre KM, Luchetti M, Randolph AG. Efficacy of interventions for bronchiolitis in critically ill infants: a systematic review and meta-analysis. *Pediatr Crit Care Med*. 2004;5:482-9.
- Simó Nebot M, Claret Teruel G, Laues Cubells C, Estrada Sabadell MD, Pou Fernandez J. Guía de práctica clínica sobre la bronquiolitis aguda: recomendaciones para la práctica clínica. *An Pediatr (Barc)*. 2010;73, 208;e1-10.
- Gonzalez de Dios J, Ochoa Sangrador C, Grupo de revisión y panel de expertos de la Conferencia de Consenso del Proyecto aBREVIADO (BRonquiolitis-Estudio de Variabilidad, Idoneidad y ADecuación. Conferencia de Consenso sobre bronquiolitis aguda (IV): tratamiento de la bronquiolitis aguda. Revisión de la evidencia científica. *An Pediatr (Barc)*. 2010;72, 285; e1-42.
- Gonzalez de Dios J, Ochoa Sangrador C, Grupo de revisión y panel de expertos de la Conferencia de Consenso del Proyecto aBREVIADO (BRonquiolitis-Estudio de Variabilidad, Idoneidad y ADecuación. Conferencia de Consenso sobre bronquiolitis aguda (I): metodología y recomendaciones. *An Pediatr (Barc)*. 2010;72, 221;e1-e33.
- Chabernaude JL, Jourdain G, Durand S. Ventilation non invasive pour la prise en charge pré-hospitalière des bronchiolites sévères du nourrisson. *Arch Pediatr*. 2009;16:726-8.
- Chevret L, Mbieleu B, Essouri S, Durand P, Chevret S, Devictor D. Bronchiolites en unité de réanimation pédiatrique: facteurs pronostiques et devenir respiratoire des nourrissons ventilés. *Arch Pediatr*. 2005;12:385-90.
- Larrar S, Essouri S, Durand P, Chevret L, Haas V, Chabernaude JL, et al. Place de la ventilation non invasive nasale dans la prise en charge des bronchoalvéolites sévères. *Arch Pediatr*. 2006;13:1397-403.
- Cambonie G, Milesi C, Jaber S, Amsellem F, Barbotte E, Picaud JC, et al. Nasal continuous positive airway pressure decreases respiratory muscles overload in young infants with severe acute viral bronchiolitis. *Intensive Care Med*. 2008;34:1865-72.
- Javouhey E, Barats A, Richard N, Stamm D, Floret D. Non-invasive ventilation as primary ventilatory support for infants with severe bronchiolitis. *Intensive Care Med*. 2008;34:1608-14.
- McKiernan C, Chua LC, Visintainer PF, Allen H. High flow nasal cannulae therapy in infants with bronchiolitis. *J Pediatr*. 2009;156:634-8.
- Mayordomo-Colunga J, Medina A, Rey C, Los Arcos M, Concha A, Menendez S. Predictores de éxito y de fracaso en la ventilación no invasiva en la bronquiolitis aguda. *An Pediatr (Barc)*. 2009;70:34-9.
- Lopez Guinea A, Casado Flores J, Martin Sobrino MA, Espinola Docio B, De la Calle Cabrera T, Serrano A, et al. Bronquiolitis grave. Epidemiología y evolución de 284 pacientes. *An Pediatr (Barc)*. 2007;67:116-22.
- Purcell K, Fergie J. Driscoll Children's Hospital respiratory syncytial virus database: risk factors, treatment and hospital course in 3308 infants and young children, 1991 to 2002. *Pediatr Infect Dis J*. 2004;23:418-23.
- Rietveld E, Vergouwe Y, Steyerberg EW, Huysman MW, De Groot R, Moll HA. Hospitalization for respiratory syncytial virus infection in young children: development of a clinical prediction rule. *Pediatr Infect Dis J*. 2006;25:201-7.
- Wang EE, Law BJ, Stephens D. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) prospective study of risk factors and outcomes in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *J Pediatr*. 1995;126:212-9.
- Hernando Puente M, Lopez-Herce Cid J, Bellon Cano JM, Villaescusa JU, Santiago Lozano MJ, Sanchez Galindo A. Factores pronósticos de evolución complicada en la bronquiolitis que requiere ingreso en cuidados intensivos pediátricos. *An Pediatr (Barc)*. 2009;70:27-33.
- Figueroa Mulet J, Osona Rodríguez de Torres B. La bronquiolitis aguda inducida por virus y la genética. *An Pediatr (Barc)*. 2010;73:159-61.
- Shay DK, Holman RC, Roosevelt GE, Clarke MJ, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated mortality and estimates of respiratory syncytial virus-associated deaths among US children, 1979-1997. *J Infect Dis*. 2001;183:16-22.



# Serum sRAGE as a Potential Biomarker for Pediatric Bronchiolitis: A Pilot Study

Alberto García-Salido · Gonzalo Oñoro · Gustavo J. Melen ·  
Vanesa Gómez-Piña · Ana Serrano-González ·  
Manuel Ramírez-Orellana · Juan Casado-Flores

Received: 2 August 2014 / Accepted: 23 October 2014  
© Springer Science+Business Media New York 2014

## Abstract

**Purpose** Traditional inflammatory biomarkers are insufficient for the evaluation of bronchiolitis severity. Recent investigations have shown that the receptor for advanced glycation end product (RAGE) and its soluble isoforms (sRAGE) play a critical role in the pathogenesis of lung injury. Main objective was to assess the serum levels of sRAGE of children with severe bronchiolitis admitted to the pediatric intensive care unit (PICU). Secondary objective was to study sRAGE correlation with the evolution and traditional biomarkers.

**Methods** Prospective, observational and descriptive study, 43 healthy controls and 37 patients (December 2011–February 2012) were enrolled. sRAGE levels were assessed and compared. In patients, the relation between sRAGE levels and clinical evolution, respiratory assistance, white blood cell count, absolute neutrophils count, serum C-reactive protein, and serum procalcitonin was analyzed.

**Results** A statistical difference was found in the mean value of sRAGE at PICU admission between patients and controls ( $1,215.7 \pm 535$  vs  $849 \pm 579$  pg/ml). Also a significant inverse correlation was found between sRAGE and the Wood–Downes Score at admission ( $p = 0.02$ ).

**Conclusions** Serum sRAGE could be elevated in children with bronchiolitis. Larger clinical studies are necessary to

elucidate its role as a bronchiolitis inflammatory and/or lung injury biomarker.

**Keywords** Bronchiolitis · Critical care medicine · Soluble receptor for advanced glycation end product

## Introduction

Bronchiolitis is the most common lower respiratory tract infection in infants <2 year of age. Respiratory syncytial virus (RSV) is the causative organism in almost 75–80 % of cases. Around 3–15 % of all infants each year require hospitalization for its treatment with a high cost for patient care [1, 2].

Admission in the pediatric intensive care unit (PICU) in case of bronchiolitis may be required. Bronchiolitis severity is mainly defined by clinical signs [3] and traditional inflammatory biomarkers are insufficient to know about the degree of underlying inflammation and/or lung injury [4].

The receptor for advanced glycation end product (RAGE) is a multi-ligand type I transmembrane glycoprotein belonging to the immunoglobulin (Ig) superfamily. RAGE is expressed constitutively in the lung [5–7]. Nowadays, it has been confirmed that RAGE is expressed in normal healthy lungs and, also, in patients with interstitial, postobstructive pneumonia, or pulmonary inflammation [8, 9]. The RAGE can interact with diverse ligands and recent investigations have shown that RAGE-axis plays a critical role in the pathogenesis of lung injury by inducing neutrophil accumulation, lung edema, and cytokine release [8]. The RAGE–ligand interaction results in rapid and sustained cellular activation and gene transcription [10–12].

A. García-Salido (✉) · G. Oñoro · A. Serrano-González ·  
J. Casado-Flores  
Pediatric Critical Care Unit, Hospital Infantil Universitario Niño  
Jesús, Avenida Menéndez Pelayo 65, Madrid, Spain  
e-mail: citopensis@yahoo.es

G. J. Melen · V. Gómez-Piña · M. Ramírez-Orellana  
Department of Pediatric Hematology and Oncology, Hospital  
Infantil Universitario Niño Jesús, Universidad Autónoma de  
Madrid, Madrid, Spain

Published online: 30 October 2014

 Springer

Under physiological or pathophysiological conditions, cells can release into the extracellular space diverse soluble isoforms of RAGE. These forms may arise from the cleavage of the extracellular region of the membrane-associated receptor (sRAGE) and/or from alternative splicing of the pre-mRNA transcripts (endogenous secretory or esRAGE) [13]. These truncated isoforms of RAGE have been also identified in the human lung and blood [7]. Because these isoforms lack a transmembrane domain, they are secreted as decoy receptors, and their putative protective roles on lung injury have been previously characterized [10, 11, 14, 15].

In this pilot study, we examined the expression of the total circulating sRAGE of children with severe bronchiolitis admitted to PICU of a tertiary hospital. Also, we speculate that sRAGE value could have a role as bronchiolitis biomarker. We studied the possible association between serum sRAGE levels and the clinical course of these children. Besides we assessed traditional biomarkers such white blood cell (WBC) count, absolute neutrophils count (ANC), serum C-reactive protein (CRP), and serum procalcitonin (PCT) and their possible correlation with sRAGE.

## Materials and Methods

This pilot study was approved by the ethics committee of the Hospital Infantil Universitario Niño Jesús of Madrid (Spain). The patients were enrolled after obtaining a written informed consent from the next of kin, caretakers, or guardians on behalf of the children. The samples from cases were obtained at PICU admission. The control group samples were obtained from the hospital blood-extractions department.

### Study Characteristics and Patients

The study was prospective, observational, and analytic. It was made from December 2011 to February 2012. The diagnosis test of RSV infection was made by antigen detection by enzyme immunoassay of nasopharyngeal aspirates (RSV-Adenovirus MonlabTest®).

Bronchiolitis was defined as the first episode of wheezing in a child younger than 12–24 months who has physical findings of a viral lower respiratory infection and no other explanation for the wheezing.

The PICU incoming criteria were also the study inclusion criteria: (1) Requirement of fraction of inspired oxygen (FiO<sub>2</sub>) superior to 0.4 to maintain oxygen saturation over 92 % or partial pressure of CO<sub>2</sub> in blood gas analysis over 65 mmHg; (2) Wood–Downes Score greater than 7 without improvement despite oxygen inhalation therapy. Bradycardia defined as heart rate less than 120 beats per minute (bpm) in patients <6 months, less than 100 bpm in

patients between 6 and 12 months, and less than 90 bpm in patients between 1 and 2 years; (3) Apnea episodes with bradycardia and/or oxygen desaturation.

### Controls

Throughout the 2012, a total of 43 healthy children were enrolled as control group. Control samples were recruited from children who came to hospital blood-extractions department because of another indication or disease. The controls were included according to the following criteria: (a) absence of diabetes mellitus type 1, (b) absence of metabolic or inflammatory diseases, and (c) no treatment with drugs known to affect the RAGE-axis (anti-inflammatory or immunosuppressive drugs). All samples were collected after signing the consent form by their caregivers.

### Samples

A blood sample was collected from each patient with severe bronchiolitis at PICU admission. The sample was centrifuged for 15 min at 1,000×*g* within 30 min of collection. The serum assays were aliquoted and immediately store at −80 °C.

Laboratory studies including WBC count, ANC, CRP, and PCT were also made. These measurements were done at the time of admission. Also, at PICU admission, a blood culture was obtained.

### Measurement of Circulating sRAGE

The serum levels of sRAGE were determined using a specific sandwich ELISA kit (Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). This ELISA is designed to measure human RAGE (extracellular domain) in cell culture supernates, serum, and plasma. Measurements were performed in duplicate and the results were averaged.

### Statistical Analysis

Statistical analysis was performed with the statistical program SPSS® 19.0 (IBM®). The age values are expressed as mean and range; the rest of continuous variables are expressed as mean and standard deviation or 95 % coefficient interval (95 % CI). The Kolmogorov–Smirnov test was applied to establish the goodness of fit to normality for the variables studied. Student's *t* test for non-paired samples was used when differences in mean values were compared. ANOVA test was used when the variable had at least three categories. Spearman's rank correlation coefficient was bi-marginally calculated to measure the relationship between two continuous variables. Findings of two-tailed *p* < 0.05 were considered statistically significant.



## Results

### Comparison of Baselines Characteristics (Study and Control Groups) and Clinical Manifestations

Thirty-seven patients were enrolled in the study. The mean age was 162 days (range 8–927 days); 18 patients were males (48.6 %). The most prevalent baseline characteristic of patients with severe bronchiolitis was the prematurity; seven patients (19 %) showed this antecedent.

The RSV was determined in all patients; 32 were positive (86.5 %). Other viruses were determined (*influenzae* and *adenovirus*) and in only one patient the RSV and the influenza virus were both positive.

The blood cultures done at PICU admission were negative in all cases. Two patients needed invasive mechanical ventilation; in both cases bacteria was isolated by bronchial culture (*Haemophilus influenza* non-typable and *Streptococcus pneumoniae*).

The control group included 43 children with a mean age of 3,096 days (range 417–6,664 days) which was the unique epidemiological significant difference with the study group ( $p < 0.001$ ).

### PICU Stay

The length of the PICU treatment was  $4.6 \pm 3.6$  days. None of the patients died or needed PICU readmission. An active respiratory support, excluding nasal cannula oxygen therapy, was applied in 28 patients (75.6 %): high-flow oxygen nasal cannulas (HFONC) 15 (40.5 %); nasal continuous positive air pressure (nCPAP) 8 (21.6 %); bilevel positive air pressure (BiPAP) 3 (8.1 %); and conventional mechanical ventilation 2 (CMV; 5.4 %). The length of active respiratory support was  $92.4 \pm 65.6$  h.

The values of the laboratory findings at admission in the study group were as follows: WBC/ $\mu$ L  $12,143 \pm 4,580$ ; ANC/ $\mu$ L  $5,757 \pm 3,448$ ; CRP (mg/dL)  $4.7 \pm 4.7$ ; and PCT (ng/mL)  $2 \pm 3.4$ .

The Wood–Downes Score was calculated in all patients of the study group by the medical doctor on call at PICU admission: 18 were considered as moderate and 19 as severe. The mean value of the Wood–Downes Score was  $7.5 \pm 1.8$ .

### Comparison of the sRAGE: Study and Control Groups

sRAGE (pg/mL) mean value in the study group was  $1,215.7 \pm 535.1$  and in the control group was  $849 \pm 579$ . A significant difference in sRAGE was found between these groups ( $p < 0.001$ ). In the Spearman correlation analysis, to assess if this difference could be because the age differences between the study and the control group, no differences were found (Fig. 1).

### Comparison of the sRAGE with Other Variables in the Study Group

There were no significant differences in the value of the sRAGE at admission in the RSV-infected versus non-infected patients ( $n = 32$ ,  $1,270 \pm 552$  pg/mL vs  $n = 5$ ,  $863 \pm 187$  pg/mL;  $p = 0.12$ ). The value of the sRAGE at admission was not different between those patients who require changes in the respiratory support to a more advanced one during the PICU admission (four patients) and those who did not require it ( $1,432 \pm 550.2$  and  $1,189.4 \pm 535.9$  pg/mL;  $p = 0.45$ ). According to the severity of the Wood–Downes Score, there were no differences in the value of sRAGE between the patients with a moderate or severe bronchiolitis ( $1,346.7 \pm 594.7$  and  $1,065 \pm 424$  pg/mL;  $p = 0.12$ ).

### Correlations of sRAGE

Clinical and laboratory variables were analyzed in order to find a correlation between the value of sRAGE and these variables (Table 1). The only variable that showed a significant correlation was the value of the Wood–Downes Score at PICU admission with the sRAGE (correlation coefficient ( $r$ )  $-0.374$ ;  $p = 0.02$ , Fig. 2).

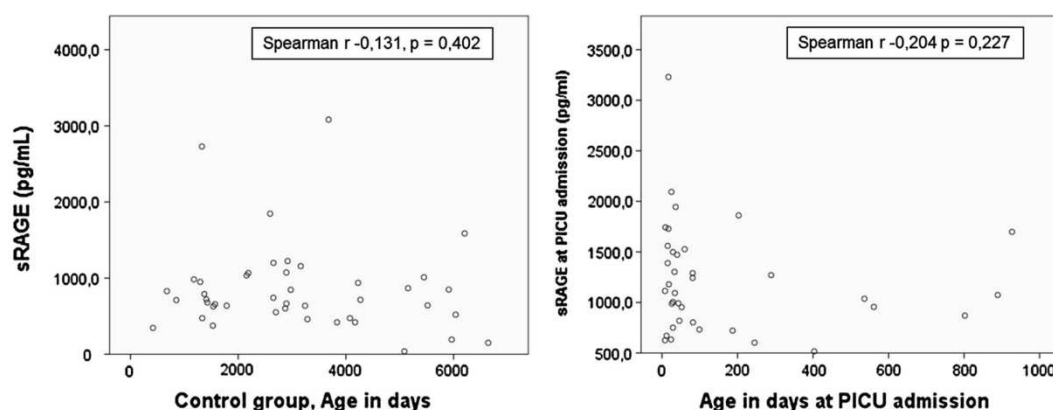
### sRAGE Values in the Different Groups of Respiratory Support

The concentrations of sRAGE at PICU admission, grouping the patients based on their maximum respiratory support during the stay in the PICU were as follows: nasal cannula oxygen therapy (nine patients)  $993.5 \pm 420.6$  pg/mL; HFONC (15)  $1,501.4 \pm 574.5$  pg/mL; nCPAP (8)  $1,189.9 \pm 461.9$  pg/mL; BiPAP (3)  $872.3 \pm 314.5$  pg/mL; and CMV (2)  $692.1 \pm 82.6$  pg/mL. No differences were found between the sRAGE values in the different respiratory support groups.

## Discussion

To the best of our knowledge, this is the first manuscript reporting an elevated serum sRAGE levels in children with bronchiolitis [7]. sRAGE levels are increased, and correlated with inflammation in diabetes, sepsis, and in murine model of RSV infection. These results lead us to hypothesize that sRAGE could participate in the inflammatory response of children with bronchiolitis [3, 5, 16].

The exact means by which RAGE signaling impacts the pathogenesis of bronchiolitis is not yet clear [7, 17, 18]. RAGE seems to be a negative regulator of IFN- $\gamma$ , and the enhanced IFN- $\gamma$  production may help to limit viral spread.



**Fig. 1** Spearman's rank correlation between sRAGE levels and age in days

**Table 1** Correlations of sRAGE with other variables

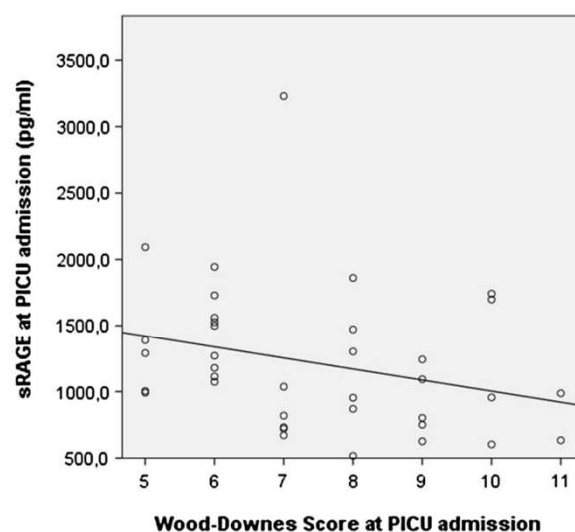
	Correlation coefficient ( <i>r</i> )	Significance ( <i>p</i> )
WBC count	0.176	0.33
ANC	0.107	0.56
CRP	-0.257	0.13
PCT	-0.154	0.42
Length of the stay in the PICU	-0.059	0.727
Hours of respiratory support	0.128	0.45
Wood-Downes Score	<b>-0.374</b>	<b>0.02</b>

Bold values are statistically significant ( $p < 0.05$ )

WBC white blood cell, ANC absolute neutrophils count, CRP C-reactive protein, PCT procalcitonin, PICU pediatric intensive care unit

Also, RAGE in bronchiolitis could participate in the host-lung inflammatory response. It is known that the absence of this receptor significantly reduced leukocyte recruitment to the lungs. At this point is crucial to highlight the differences in the functions of membrane and sRAGE. Although signaling via membrane RAGE induces an inflammatory response, interactions between sRAGE, RAGE ligands, and membrane RAGE seem to be mechanisms by which the host can down-modulate inflammation [17–21].

In our pilot study, sRAGE was measured at PICU admission. We have seen that sRAGE is elevated in case of severe bronchiolitis compared with healthy controls. Additionally, our data showed an inverse correlation between the sRAGE levels and the Wood-Downes Score at PICU incoming. In our pilot study, elevated sRAGE levels, acting as a decoy receptor and down-modulating the inflammation, might be associated with less inflammation, and lung injury, produced by the bronchiolitis [17, 18, 22]. Patients with circulating sRAGE levels high enough as to block the lung RAGE-axis would show less clinical affection and, as a consequence, would also need less



**Fig. 2** Scatter graph of Wood-Downes Score versus sRAGE at PICU admission

respiratory support [19–21]. As it has been previously described in adult patients with acute lung injury and acute respiratory distress syndrome [13, 16, 23–25], our findings suggest that increased sRAGE levels could be associated with the injury of the airway epithelial cells in bronchiolitis. On the other hand, low sRAGE levels might indicate a predisposition to a clinical worsening or respiratory insufficiency [17, 18].

There are several limitations to this study. Firstly, the work was conceived as a pilot study with a unique time point for measurement, explaining the number of patients, samples, and the age of the controls. The statistical power was not previously calculated, so we did not collect an enough number of patients in the BiPAP and CMV groups. Also, our results were obtained in patients with severe bronchiolitis, and they might be different or weaker in



milder forms of the disease. Differences in sRAGE levels seem relatively low from a clinical perspective and based on available data in such a clinical setting, suggesting they may not be clinically significant. Therefore, we think that the necessity of study bronchiolitis lung injury biomarkers justify this kind of observational, short time courses, exploratory-type designed study. Finally, serum samples used in this study had been stored for several months at  $-80^{\circ}\text{C}$ , as reported in previous studies; whether this extended storage has any effects on sRAGE levels remains unknown.

In summary, we report for the first time that serum sRAGE is elevated in children with bronchiolitis compared to healthy children. Furthermore in these patients, sRAGE levels showed an inverse correlation with the Wood–Downes Score and its meaning is still unclear. Further larger clinical studies, with repeated measurements of sRAGE, are needed in order to elucidate whether sRAGE may become a useful biomarker of bronchiolitis severity [4, 21].

**Acknowledgments** Thanks to all the medical doctors, nurses, and auxiliaries from our PICU. Thanks to the nurse-team from the hospital blood-extractions department. Thanks to all the children who participate in this study. Thanks to their caregivers for their patience and comprehension. This work was partially funded by the National Health Service of Spain Grant FIS PI11/00066 and Sociedad Estatal Loterías y Apuestas del Estado of Spain (No. 1203001).

**Conflict of interest** There is no potential conflict of interest.

## References

- Mansbach JM, Piedra PA, Stevenson MD et al (2012) Prospective multicenter study of children with bronchiolitis requiring mechanical ventilation. *Pediatrics* 130:e492–e500
- Ochoa Sangrador C, Gonzalez de Dios J, Research Group of the aBREVIADo Project (2012) Management of acute bronchiolitis in emergency wards in Spain: variability and appropriateness analysis (aBREVIADo Project). *Eur J Pediatr* 171:1109–1119
- Kawasaki Y, Endo K, Suyama K et al (2011) Serum SP-D levels as a biomarker of lung injury in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Pulmonol* 46:18–22
- Ricart S, Marcos MA, Sarda M et al (2012) Clinical risk factors are more relevant than respiratory viruses in predicting bronchiolitis severity. *Pediatr Pulmonol*. doi:10.1002/ppul.22633
- Mukherjee TK, Mukhopadhyay S, Hoidal JR (2008) Implication of receptor for advanced glycation end product (RAGE) in pulmonary health and pathophysiology. *Respir Physiol Neurobiol* 162:210–215
- Neeper M, Schmidt AM, Brett J et al (1992) Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J Biol Chem* 267:14998–15004
- Yerkovich ST, Chang AB, Carroll ML et al (2012) Soluble receptor for advanced glycation end products (sRAGE) is present at high concentrations in the lungs of children and varies with age and the pattern of lung inflammation. *Respirology* 17:841–846
- Buckley ST, Ehrhardt C (2010) The receptor for advanced glycation end products (RAGE) and the lung. *J Biomed Biotechnol* 2010:917108
- Yan SF, Ramasamy R, Schmidt AM (2010) Soluble RAGE: therapy and biomarker in unraveling the RAGE axis in chronic disease and aging. *Biochem Pharmacol* 79:1379–1386
- Santilli F, Vazzana N, Bucciarelli LG et al (2009) Soluble forms of RAGE in human diseases: clinical and therapeutic implications. *Curr Med Chem* 16:940–952
- Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM (2009) RAGE: therapeutic target and biomarker of the inflammatory response—the evidence mounts. *J Leukoc Biol* 86:505–512
- Gonzalez I, Romero J, Rodriguez BL et al (2013) The immunobiology of the receptor of advanced glycation end-products: trends and challenges. *Immunobiology* 218:790–797
- Hergueter AH, Nguyen K, Owen CA (2011) Matrix metalloproteinases: all the RAGE in the acute respiratory distress syndrome. *Am J Physiol* 300:L512–L515
- Drinda S, Franke S, Eidner T et al (2009) Decreased RAGE expression in peripheral blood mononuclear cells of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 27:483–490
- Detoraki A, Gil AP, Spiliotis BE (2009) Association between serum levels of the soluble receptor (sRAGE) for advanced glycation endproducts (AGEs) and their receptor (RAGE) in peripheral blood mononuclear cells of children with type 1 diabetes mellitus. *J Pediatr Endocrinol Metab* 22:895–904
- Frommhold D, Kamphues A, Dannenberg S et al (2011) RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner. *BMC Immunol* 12:56
- Agostoni P, Banfi C, Magri D et al (2011) Kinetics of plasma SPB and RAGE during mechanical ventilation in patients undergoing major vascular surgery. *Respir Physiol Neurobiol* 178:256–260
- Guo C, Zeng X, Song J et al (2012) A soluble receptor for advanced glycation end-products inhibits hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis in rat cardiomyocytes via the mitochondrial pathway. *Int J Mol Sci* 13:11923–11940
- Griffiths MJ, McAuley DF (2008) RAGE: a biomarker for acute lung injury. *Thorax* 63:1034–1036
- Chen Y, Akirav EM, Chen W et al (2008) RAGE ligation affects T cell activation and controls T cell differentiation. *J Immunol* 181:4272–4278
- Bopp C, Hofer S, Weitz J et al (2008) sRAGE is elevated in septic patients and associated with patients outcome. *J Surg Res* 147:79–83
- Jabaudon M, Futier E, Roszyk L et al (2011) Soluble form of the receptor for advanced glycation end products is a marker of acute lung injury but not of severe sepsis in critically ill patients. *Crit Care Med* 39:480–488
- Kneyber MC, Gazendam RP, Niessen HW et al (2009) Mechanical ventilation during experimental sepsis increases deposition of advanced glycation end products and myocardial inflammation. *Crit Care* 13:R87
- Calfee CS, Budev MM, Matthay MA et al (2007) Plasma receptor for advanced glycation end-products predicts duration of ICU stay and mechanical ventilation in patients after lung transplantation. *J Heart Lung Transpl* 26:675–680
- Mauri T, Masson S, Pradella A et al (2010) Elevated plasma and alveolar levels of soluble receptor for advanced glycation end-products are associated with severity of lung dysfunction in ARDS patients. *Tohoku J Exp Med* 222:105–112